

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Diana Nõmmemees

***Annexin A5* geeni promootori haplotüüpide seos korduva raseduse
katkemisega Eesti ja Taani naistel**

Bakalaureusetöö

Juhendaja: Liina Nagirnaja PhD

TARTU 2014

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. Spontaanabort	8
1.2. Korduv raseduse katkemine	9
1.2.1. Peamised KRK põhjused	9
1.2.2. Trombofiilsed häired kui KRK riskifaktorid	13
1.2.2.1. Trombofiilseid häireid põhjustavad geneetilised riskifaktorid	13
1.3. Trombofiilne faktor annexin A5	15
1.3.1. ANXA5 funktsioon	16
1.3.2. Annexin A5 roll haiguste kujunemisel	16
1.3.2.1. Muud haigused	16
1.3.2.2. ANXA5 seos raseduspatoloogiatega	17
1.3.3. ANXA5 geneetiline varieeruvus korduva spontaanabordi puhul	18
2. EKSPERIMENTAALOSA	20
2.1. Töö eesmärgid	20
2.2. Materjal ja meetodika	20
2.2.1. Valim	21
2.2.2. DNA eraldamine	22
2.2.3. ANXA5 promootoriala amplifikatsioon	22
2.2.3.1. PCR Eesti valimile I praimeripaariga	24
2.2.3.2. PCR Eesti ja Taani valimile II praimeripaariga	25
2.2.4. Eesti valimi sekveneerimine	25
2.2.5. Restriktsioon	26
2.2.6. Andmete statistiline analüüs	26
2.2.6.1. Polümorfismide tuvastamine	26
2.2.6.2. Haplotüüpide tuvastamine	27
2.2.6.3. Võrdlus andmebaasidega	27
2.3. Tulemused	29
2.3.1. ANXA5 promootori analüüs Eesti valimis	29

2.3.1.1.	DNA eraldamine ja <i>ANXA5</i> promootori amplifikatsiooni tulemus	29
2.3.1.2.	Polümorfismide tuvastamine	29
2.3.1.3.	Haplotüüpide tuvastamine	31
2.3.2.	<i>ANXA5</i> promootori M2 riskihaplotüübi määramine Eesti ja Taani valimis restriktsioon-analüüsi meetodil	32
2.3.2.1.	M2 riskihaplotüübi määramine Eestis	32
2.3.2.2.	<i>ANXA5</i> riskihaplotüüp Taanis.....	33
2.3.3.	<i>ANXA5</i> promootori SNP-d ja haplotüübid võrdlevalt populatsioonipõhiste kohortidega ning varasemalt publitseeritud uuringutega	34
2.3.3.1.	<i>ANXA5</i> promootori polümorfismide võrdlev analüüs	34
2.3.3.2.	<i>ANXA5</i> promootori haplotüüpide võrdlev analüüs	36
2.4.	Arutelu	39
2.4.1.	<i>ANXA5</i> geeni varieeruvus ja seos korduva raseduse katkemisega.....	39
2.4.2.	Kitsaskohad geneetilise assotsiatsiooniuuringute teostamisel KKK puhul.....	39
2.4.3.	<i>ANXA5</i> bioloogiline roll kui geneetilist assotsiatsiooniuuringut mõjutav faktor...	41
KOKKUVÕTE		44
SUMMARY		45
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU		47
KASUTATUD VEEBIAADRESSID		59
LISAD		60
LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ ELEKTROONILISEKS AVALDAMISEKS		61

KASUTATUD LÜHENDID

ANXA5 – annexin A5 geen

APC – aktiveeritud proteiin C

BamHI – *Bacillus amyloliquefaciens*-i tüüp II restriksiooni endonukleas

bp – *base pair*, nukleotiidipaar

CD4+ – T abistajarakk

CD8+ – T-tsütotoksiline rakk

CEU – Põhja- ja Lääne-Euroopa päritoluga Utah elanike valim

CHB – Han hiinlaste valim Pekingist Hiinast

CpG saar – DNA regioon, mis on rikastatud CpG saitidega. GC sisaldus üle 50%

dbSNP – *Single Nucleotide Polymorphism Database*, ühenukleotiidsete polümorfismide andmebaas

DEN – Taani valim

EDTA – etüleendiamiintetraatseethape

EST – Eesti valim

Exo-SAP – eksnonukleas I puhvri ja *Shrimp alkaline phosphatase* (kreveti aluseline fosfataas) segu

GTP – guanosiintrifosfaat

h.p. – hinnang puudub

HLA- DRB1*01 (HLA-DR1) – inimese leukotsüüdi antigeeni peamise koesobivuskompleksi pinnaretseptori geen (sulgudes geeni äratundev serotüüp)

HLA- DRB1*03 (HLA-DR3) – inimese leukotsüüdi antigeeni peamise koesobivuskompleksi pinnaretseptori geen (sulgudes geeni äratundev serotüüp)

IFN- γ – interferoon γ

IL-10 – interleukiin 10

IL-4 – interleukiin 4

JPT – Tokyo jaapanlaste valim

KORA – *Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg*; Kooperatiivne terviseuuring Augsburgi regioonis ehk Lõuna-Saksamaa biopank

KRK – korduv raseduse katkemine

M – marker

mRNA – *messenger RNA*; RNA, mille molekulilt toimub translatsioon

MTHFR – metüleentetrahydrofolaadi reduktaas

mv – mediaanvektor

a.p. – andmed puuduvad

LD – *linkage disequilibrium*, geneetilise aheldatuse mittetasakaalulisus

NK – negatiivne kontroll

PCR – *Polymerase Chain Reaction*, polümeraasi ahelreaktsioon

r^2 – alleelisageduste korrelatsioonikoefitsient

RCF – *Relative Centrifugal Force*, relatiivne tsentrifugaaljõud

rs kood – unikaalne SNP identifitseerimisnumber dbSNP-s

S – *singleton*, ühel kromosoomil esinenenud SNP

SDS – anioonne surfaktant

SNP – *single nucleotide polymorphism*, ühenukleotiidne polümorfism

TBE – Tris-boorhape-EDTA puhvrilahus

TE – puhvrilahus, mis koosneb Tris-ist ja EDTA-st

T_h1 – T abistajarakk, aktiveerib makrofaage

T_h2 – T abistajarakk, aktiveerib B rakke

TNF- α – kasvaja nekroosi faktor α

Tris – ehk THAM , tris(hüdroksümetüül)aminometaan

Triton-X – mitteioonne surfaktant

Tsp – *transcription start point*, transkriptsiooni algussait

wt – *wild type*, metsiktüüp

SISSEJUHATUS

2012. aastal lõppes Eestis 2,6% rasedustest iseenesliku spontaanabordiga (Eesti Meditsiinilise Sünniregistri ja Raseduskatkestusandmekogu). Korduv raseduse katkemine (KRK) on paari jaoks traumaatiline haigus, mis diagnoositakse, kui esineb vähemalt 3 iseeneslikku spontaanaborti järjest ning. Pooltel juhtudel jääb põhjus määratlemata ning on seega defineeritud kui idiopaatiline KRK.

Korduv raseduse katkemine (KRK) on väga heterogeenne haigus, mida võivad põhjustada muuhulgas anatoomilised, hormonaalsed, immunoloogilised ja kromosomaalsed faktorid aga ka geneetilised riskifaktorid (Rull *et al.*, 2012). Enim on uuritud trombofiiliat põhjustavaid mutatsioone, kuid seni ei ole tuvastatud ühtegi (epi)geneetilist markerit, mis oleks spetsiifiline KRK-le.

Hiljuti pakuti välja uus korduva spontaanabordi trombofiilia riskifaktor – *ANXA5* (Bogdanova *et al.*, 2007). Annexin A5 on platsenta antikoagulantvalk, mis esineb platsentahattude pinnal, moodustades kaitsva kristallkihi raku pinna fosfolipiididele, inhibeerides hüübimist (Rand *et al.*, 2003). Antud valgu vähenemine võib põhjustada erinevaid rasedustüsistusi nagu pre-eklampsia või raseduse katkemine (Gourvas *et al.*, 2014; Chinni *et al.*, 2009). Annexin A5 valku kodeeriva geeni (*ANXA5*) promootorist tuvastasid Bogdanova *et al.*, 2007 esmakordselt neli nukleotiidiasendust, mis päranduvad edasi ühe haplotüübina. See riskihaplotüüp vähendab *ANXA5* geeni ekspressiooni 37-42%-ni normist ning tõstab eri uuringute põhjal riski korduvas raseduse katkemiseks (Bogdanova *et al.*, 2007; Tiscia *et al.*, 2009; Miyamura *et al.*, 2011). Siiski erineb *ANXA5* geneetiliste assotsiatsiooniuuringute tulemustes erinevusi ning annexin A5 roll KRK esinemisel ei ole üheselt määratud.

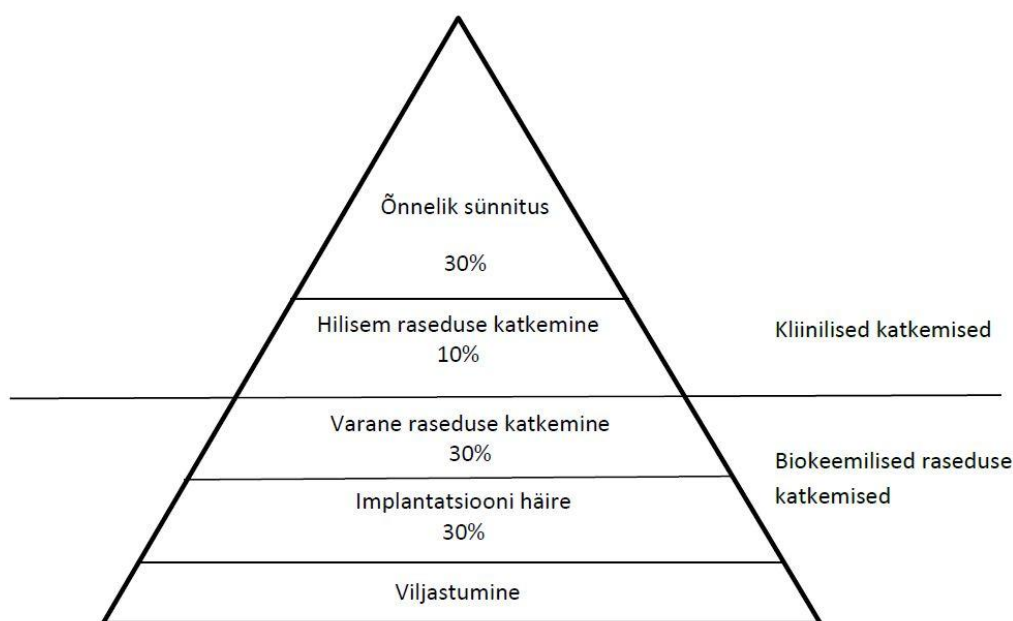
Käesoleva uurimistöö eesmärkideks on anda ülevaade korduva raseduse katkemise põhjustest ning tuvastada seos *ANXA5* geeni promootori haplotüüpide ja korduva spontaanabordi vahel Eesti ja Taani naistel. Antud uurimustöö on replikatsiooniuuring Bogdanova *et al.*, 2007 tööle.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Spontaanabort

Kõigist viljastumistest läheb 70% kaotsi enne sünnitust, enamus enne kui rasedust saab kliiniliselt tõestada (Zinaman *et al.*, 1996 ja Macklon *et al.*, 2002) (Joonis 1). Kliiniliselt ultraheliga tõestatud rasedustest katkeb ligikaudu 10-15% (Nybo Andersen *et al.*, 2000; Warburton ja Fraser, 1964) ning seega on raseduse katkemine I trimestri kõige sagedasem komplikatsioon. Spontaanabort on iseeneslik raseduse katkemine enne loote elujõuliseks saamist ehk kõik katkemised viljastumise hetkest kuni 24. rasedusnädalani (Rai ja Regan, 2006).

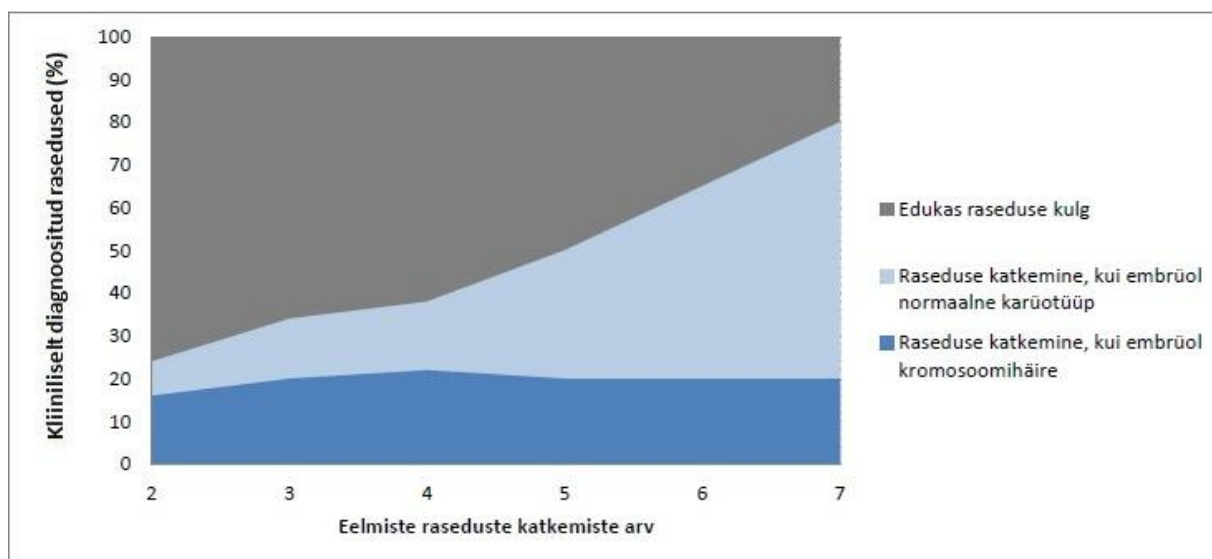
Spontaanaborti põhjustab 70% juhtudest loote kromosoomi anomaaliad (Ogasawara *et al.*, 2000). Kõige sagedasem on trisoomia, sellele järgneb polüploidus, X monosoomia ja tasakaalustamata translokatsioonid (Stephenson *et al.*, 2002). Kromosoomihäirete sagedus tõuseb nii isa (Slama *et al.*, 2005) kui ka ema vanuse kasvades. Nooremal emal on tõenäosus tsütogeneetilisteks anomaaliateks 1/500, 35-aastaselt 1/80 ning 45-aastaselt 1/20 (Hook, 1981). Spontaanaborti võivad põhjustada ka platsenta vääramised, infektsioon, ema ja loote vaheline immuunvastuse sobimatus, narkomaania ja alkoholism.



Joonis 1. Raseduse katkemise jäämägi: ülevaade viljastumise hetkest sünnini. Enamus spontaanaborte toimub enne implantatsiooni või enne menstruatsiooni ärajäämist, seetõttu ei tea naine rasestumisest. Biokeemilise raseduse katkemise (tavaliselt enne 6. rasedusnädalat) puhul on rasedustest positiivne, aga rasedust pole veel ultraheliga kinnitatud. Kliinilise katkemise puhul on emakasisene rasedus lisaks ultraheliga kinnitatud. Joonis modifitseeritud Macklon *et al.*, 2002 järgi.

1.2. Korduv raseduse katkemine

Last soovivate paaride seas esineb korduvat spontaanaborti 1%.-l, mis on suurem kui juhuslikult kolme järjestikuse raseduse katkemise tõenäosuse ($0,15^3 = 0,34\%$) põhjal võiks eeldada (Berry *et al.*, 1995). Seetõttu loetakse korduvat raseduse katkemist (KRK) spontaanabortist eraldiseisvaks nähtuseks. Korduv spontaanabort on kolme või enama järjestikuse iseenesliku raseduse katkemine enne 22. rasedusnädalat või kui loode kaalub katkemise ajal vähem kui 500g (Berry *et al.*, 1995). Ligikaudu 50% KRK-st on idiopaatilised ehk teadmata põhjusega (Bricker ja Farquharson, 2002). Korduvate spontaanabortide puhul kaasneb risk ka järgneva raseduse katkemiseks: mida rohkem katkemisi, seda suurema tõenäosusega katkeb ka järgmine (Ogasawara *et al.*, 2000). Normaalse karüotüübi esinemise tõenäosus aborteerunud loodetel suureneb iga järgneva raseduse katkemisega, samas kui kromosoomihäirega loodete esinemine jääb samaks (Ogasawara *et al.*, 2000) (Joonis 2). Seega domineerivad raseduse katkemise puhul teised riskifaktorid kui kromosomaalsed anomaaliad.



Joonis 2. Normaalse ja kromosoomihäirega karüotüübiga raseduse katkemise tõenäosuse sõltuvus eelnevate raseduse katkemiste arvust. Modifitseeritud Ogasawara *et al.*, 2000 järgi.

1.2.1. Peamised KRK põhjused

Korduval raseduse katkemisel on leitud palju erinevaid põhjuseid (Tabel 1), sealhulgas on olulised anotoomilised, hormonaalsed, immunoloogilised ja geneetilised faktorid.

Tabel 1. Korduva spontaanabordi peamised riskifaktorid ja hinnanguline esinemissagedus KRK patsientidel.

Põhjused	Esinemis- sagedus KRK patsientidel (%)	Viited
Emaka anomaalia	1-16,7	Habayeb ja Konje, 2004; Saravelos <i>et al.</i> , 2008; Stray-Pedersen ja Stray-Pedersen, 1984
Hormonaalne häire	5-20	Stray-Pedersen ja Stray-Pedersen, 1984; Stephenson, 1996
Antifosfolipiid antikehad	11-20	Stephenson, 1996; Habayeb ja Konje, 2004
Alloimmuunsushäire	h.p.	Rai ja Regan, 2006; Hill <i>et al.</i> , 1992
Kromosomaalsed anomaaliad	2-4,8	Garcia- Enguidanos <i>et al.</i> , 2002; Habayeb ja Konje, 2004; Stray-Pedersen ja Stray-Pedersen, 1984
DNA fragmentatsioon spermas	39	Evenson <i>et al.</i> , 1999
Endomeetriumi infektsioon	0,5-15	Stray-Pedersen ja Stray-Pedersen, 1984; Stephenson, 1996
Trombofiilsed häired	14	Habayeb ja Konje, 2004
Vale elustiil	h.p.	Nybo Andersen <i>et al.</i> , 2012; Metwally <i>et al.</i> , 2010; Bech <i>et al.</i> , 2005

h.p. – hinnang puudub

Emaka anomaaliaid esineb kuni 16,7%-l KRK naispartneritest (Saravelos *et al.*, 2008). Naistel, kellel on vaheseinaga emakas, on suurem tõenäosus esimese trimestri raseduse katkemiseks kui normaalse emakaga naistel. Kaaremakaga naistel on suurem tõenäosus teise trimestri katkemiseks ja enneaegseks sünnituseks (Woelfer *et al.*, 2001). Arvatakse, et emaka vahesein häirib embrüo arengut pärast implantatsiooni (Homer *et al.*, 2000). Emaka müoom ja liited emakaõõnes (Ashermanni sündroom) võivad raskendada viljastumist ning suurendavad riski rasedustüsistusteks. Emaka müoom on 5% juhtudest oluline raseduse katkemise ja viljatuse põhjustaja (Bajekal ja Li, 2000). Emakakaela puudulikkus põhjustab teise trimestri katkemisi ning seda esineb 13% KRK paaridest (Stray-Pedersen ja Stray-Pedersen, 1984).

Hormonaalsed häired esinevad 5-20%-l KRK paaridest (Stray-Pedersen ja Stray-Pedersen, 1984; Stephenson, 1996). Korduva spontaanabordiga on seostatud:

- 1) Progesterooni defitsiiti luteaalfaasi ajal põhjustab ebapiisavat endomeetriumi küpsemist (Branch *et al.*, 2010).
- 2) Hüperprolaktineemia (Rai ja Regan, 2006).

- 3) Polütsüstilise munasarja sündroom on kõige sagedasem endokriinne häire viljakas eas naistel (Christiansen *et al.*, 2008). KRK patsientidel esineb seda 8-10% (Cocksedge *et al.*, 2009), kuid elussünnituste osakaal ei erine kontrollidest (Rai *et al.*, 2000).
- 4) Endometriaalse prolaktiini ekspressiooni puudumine luteaalfaasi ajal (Garzia *et al.*, 2004).
- 5) Ravimata kilpnäärmehaiguseid (Abalovich *et al.*, 2002).
- 6) Insuliini resistentsust esineb KRK patsientidel rohkem kui kontrollidel (Craig *et al.*, 2002). Kõrge veresuhkur on embrüole toksiline, sellepärast on eriti oluline glükoositaseme kontroll raseduse algstaadiumites (Rosenn *et al.*, 1991).

Immunoloogilisi põhjuseid saab jagada kaheks: autoimmuunsus- ja alloimmuunsusfaktorid. Autoimmuunsuse puhul keha ründab oma rakke, tootes rakkude vastu antikehi. Antifosfolipiid antikehad ründavad negatiivselt laetud fosfolipiidmolekule, mis moodustavad rakupinna ja raku organellide membraani. Antifosfolipiidsündroom on ravitav korduva spontaanabordi põhjus. Kõige rohkem uuritud antifosfolipiidantikehad on antikardioliipin antikeha ja luupuse antikoagulant. Neid antikehi on leitud suurema sagedusega KRK patsientidelt kui kontrollidelt (Christiansen, 1996). Antifosfolipiid antikehi esineb pidevalt 15% KRK patsientide testides (Rai *et al.*, 1995a). Ravita katkeb rasedus 90% juhtudest (Rai *et al.*, 1995b).

Alloimmuunsus on immuunvastus võõrantikehadele, mis pärinevad sama liigi teiselt esindajalt. Lim *et al.*, 1996 postuleeris, et ema liigne immuunvastus loote vastu võib olla korduva raseduse katkemise põhjustajaks. KRK patsientidel on loomulikke tapjarakke emaka limaskestas rohkem kui kontrollidel ning mida kõrgem loomulike tapjarakkude tase, seda suurem on risk raseduse katkemiseks (Rai ja Regan, 2006). Loomkatsete põhjal arvatakse, et T_H1 tsütokiinid (TNF- α , IFN- γ) ohustavad rasedust ning T_H2 tsütokiinid (IL-4, IL-10) on kasulikud ja ennetavad raseduse katkemist (Wegmann *et al.*, 1993). Enne rasedust või I trimestri ajal perifeersest verest võetud mononukleaarsed rakud toodavad trofoblasti antigeeni või mitogeeni stimuleerides KRK naistel T_H1 tsütokiine, aga kontrollidel toodavad T_H2 tsütokiine (Hill, 1995). Embrüole toksilisi ja trofoblasti inhibeerivaid T_H1 tsütokiine leitakse korduva spontaanabordi grupist vastavalt 90% ja 50% juhtudel (Hill *et al.*, 1992). Lisaks võib CD4+ ja CD8+ T rakkude suhe olla KRK naistel erinev normist (Christiansen *et al.*, 2005) ning see võib viia loote äratõukereaktsioonini. Korduva spontaanabordi eelsoodumuseks peetakse ka HLA-DRB1*01 (HLA-DR1) ja HLA-DRB1*03 (HLA-DR3) alleelide esinemist (Christiansen, 1996).

Kromosomaalseid anomaaliaid (tihti balansseeritud translokatsioonid) esinevad 3%-l KRK partneritest (Stray-Pedersen ja Stray-Pedersen, 1984). Balansseeritud translokatsiooni kandja on fenotüübilt normaalne, kuid kromosoomide segregatsiooni häire tõttu meioosis on 50-70% gameetidest ja seega ka embrüotest ebanormaalsed.

Hiljuti tehtud meta-analüüsis näidati kõrgema **DNA fragmentatsiooni** puhul **spermas** suuremat riski raseduse katkemiseks (Robinson *et al.*, 2012). Spermatosoid pole võimeline DNA-d ise parandama ning see ülesanne jääb ootsüüdi kanda pärast viljastumist. Kaheahelalisi DNA katkemisi, mida tõenäoliselt ei ole ootsüüdis elimineeritud, on seostatud idiopaatilise korduva raseduse katkemisega paaridel, kus puudub ema faktor (Ribas-Maynou *et al.*, 2012).

Suur osa KRK patsiente ei ole sub- vaid on superfertiilsed ehk nad rasestuvad kiiresti, aga rasedus ei jää püsima (Salker *et al.*, 2010). Quenby *et al.*, 2002 tõi välja hüpoteesi, et KRK naiste keha ei hülga normaalseid embrüoid, vaid neis pesastuvad elujõuetud embrüod ebasobivalt. Normaalselt katkeks rasedus biokeemilises staadiumis, kuid korduva spontaanabordi puhul püsivad nad elus kliinilise raseduseni. Endomeetriumi strooma rakud migreeruvad embrüo pesastumise ajal ja võivad soodustada implantatsiooni embrüo ümber kapseldumisega (Brosens ja Gellersen 2010). KRK patsientide endomeetriumi strooma rakkudel on suurenenud migratsiooniline potentsiaal ja vähenenud selekteerimisvõime madala kvaliteediga embrüote suhtes (Larsen *et al.*, 2013).

Korduva spontaanabordi põhjuseks pakutakse ka **endomeetriumi infektsioone**. Klamüüdia, gonorröa ja tuberkuloosi infektsioon põhjustab endometriiti, mis esineb sagedamini pärast raseduse katkemist või sünnitust. Korduva spontaanabordi põhjustamiseks peab infektsioon suguteedes püsima pikka aega. Bakteriaalse vaginoozi esinemine esimesel trimestril on seostatud hilise raseduse katkemise ja enneaegse sünnitusega (Hay *et al.*, 1994).

Erinevaid **elustiile** on seostatud raseduse katkemisega. Isegi tagasihoidlike alkoholi koguste tarbimine enne 16 gestatsiooninädalat suurendab riski raseduse katkemiseks (Nybo Andersen *et al.*, 2012). Siit võib järeldada, et pideva alkoholitarbimise puhul on risk korduvaks spontaanabordiks suurem. Samuti on rasvunud ja alakaalus KRK naistel suurenenud risk spontaanabordiks järgmisel rasedusel (Metwally *et al.*, 2010). Raseduse katkemise risk suureneb kaks korda kui tarbida kohvi üle 7 tassi päevas (Bech *et al.*, 2005).

Spontaanabordil on täheldatud perekondlikku eelsoodumust: KRK patsientide esimese astme naissugulastel on 2-7 korda suurem risk raseduse katkemiseks kui üldpopulatsioonil (Christiansen, 1996). Päriliku komponendi välja selgitamiseks on läbi viidud hulgaliselt assotsiatsiooniuuringuid.

1.2.2. Trombofiilsed häired kui KRK riskifaktorid

Trombofiilne defekt on häire vere koagulatsioonirajas, mis suurendab tromboosiriski. Rasedus on loomulik hüperkoagulatiivne seisund vältimaks suurt verekaotust sünnituse või raseduse katkemise järgselt. Üleliigset vere koagulatsiooni soodustavad trombofiilsed riskifaktorid põhjustavad platsenta veresoontes trombe, mis omakorda põhjustavad platsentas infarkti koldeid (Larsen *et al.*, 2013). Protrombootiline seisund esineb 48-59% korduva raseduse katkemisega patsientidel ka rasedusvälisel ajal (Laude *et al.*, 2001). Omandatud ja pärilikke trombofiiliaid on seostatud ka pre-eklampsia, emakasisesse kasvupeetuse ja platsenta irdumisega (Kupferminc *et al.*, 1999). Vaatamata suurele arvule töödele ei ole trombofiilseid faktoreid veenvalt seostatud varajase raseduse katkemisega. Kuna ema verevool platsentasse ei toimu enne 8. gestatsiooninädalat, siis trombofiilsed häired on riskifaktoriteks eelkõige pärast teist raseduskuud (Rai ja Regan, 2000). Antifosfolipiidsündroom on peamine tõestatud trombofiiliahäire, mida on seostatud erinevate raseduspatoloogiatega (McNamee *et al.*, 2012).

1.2.2.1. Trombofiilseid häireid põhjustavad geneetilised riskifaktorid

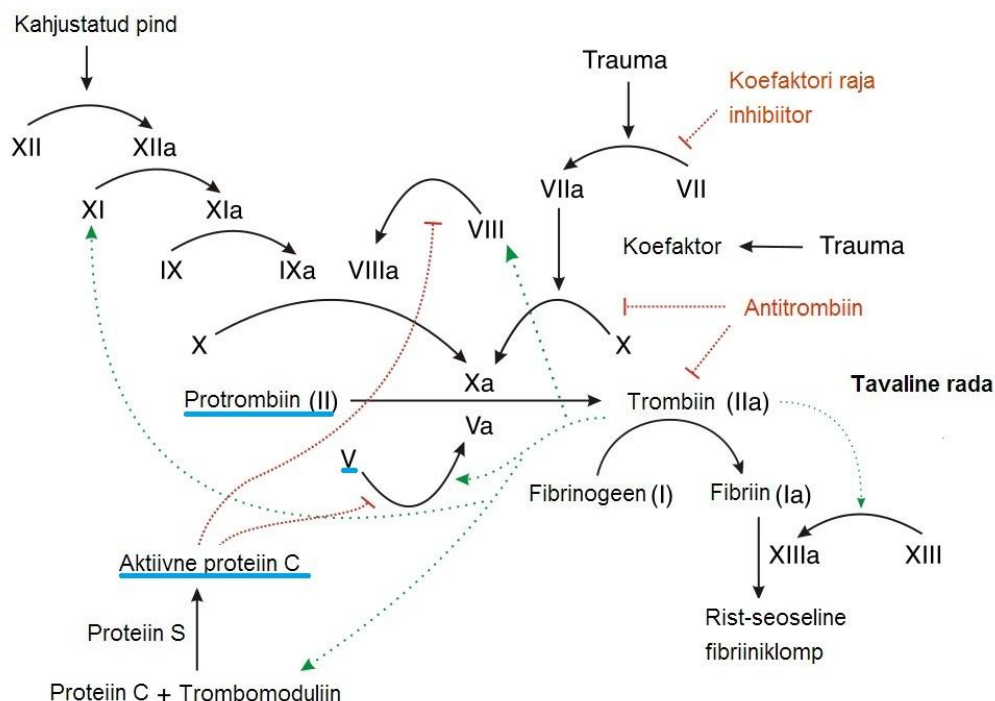
Korduva raseduse katkemisega patsientidel esineb trombofiilseid häired 14%-l (Habayeb ja Konje, 2004), kuid ühtegi geneetilist polümorfismi pole eraldiseisvalt KRK-ga seostatud (Christiansen *et al.*, 2008). Arvatakse, et mida rohkem trombofiilseid polümorfisme naisel esineb, seda kõrgem on risk raseduse katkemiseks (Brenner *et al.*, 1999). Korduva spontaanabordiga paaridel, kus kummalgi partneril on rohkem kui üks mutatsioon, on elussünni sagedus 17% ja paaridel, kellel pole polümorfisme, on sagedus 56% (Jivraj *et al.*, 2006).

Enamus trombofiilse häire kandidaatgeenidest, mida on uuritud seoses KRK-ga, on seotud hüübimise aktivatsioonikaskaadiga (Joonis 3). Üheks kõige levinumaks trombofiilse häire geneetiliseks riskifaktoriks on **Leideni mutatsioon** ehk polümorfism G → A positsioonis 1691 faktor V geenis, mille tagajärjel toimub mittesünonüümne aminohappe vahetus positsioonis 506 arginiin → glutamiiniks (Tabel 2) (Bertina *et al.*, 1994). Faktor V koos faktor Xa-ga osaleb verehüübe kaskaadis, mille lõpptulemuseks on vereklomp (Joonis 3). Aktiveeritud proteiin C (APC) on antikoagulant ja lagundab faktor V-te (Guinto ja Esmon, 1984). Polümorfismi korral lõikab APC faktor V Gln506 aeglasemalt (Lane ja Grant, 2000), mis soodustab trombide teket protrombiini pikema elua tõttu. Mutatsiooni kannab 2-19 % KRK naistest ning 2-6% kontrollidest (Tabel 2) (Jivraj *et al.*, 2006; Rai *et al.*, 2001; Younis *et al.*, 2000). Leideni defekti kandjatel on 2 korda suurem tõenäosus korduvaks raseduse katkemiseks (Kovalevsky *et al.*, 2004). Leideni alleeli kandvatel KRK naistel on 37,5% elussünnide, samas kui alleeli mittekanvatel korduva spontaanabordiga patsientidel on 69,3%

elussünde (Rai *et al.*, 2002b). Lisaks vanemate genotübile, on oluline ka loote faktor V Leideni polümorfismi olemasolu raseduse tulemuse ennustamisel (Dizon-Townson *et al.*, 1997).

Kontaktaktivatsiooni rada

Koefaktori rada



Joonis 3. Ülevaatluk vere hüübimise aktivatsioonikaskaad ja selles osalevad faktorid. Punaka joonega on välja toodud negatiivne tagasiside (inhibitsioon) ja roheline katkendliku joonega positiivne tagasiside. KRK esinemisega seotud faktorid on sinisega alla joonitud. Modifitseeritud Wikimedia Commonsi põhjal.

Tabel 2. Trombofiilseid häired põhjustavad geneetilised faktorid.

Faktor/Geen	Mutatsiooni positsioon geenis	Aminohappe muutus	Sagedus üld-populatsioonis (%)	Sagedus KRK naistel (%)	Viited
Faktor V Leiden	G1691A	Arg→Gln	2 - 6	2 - 19	Jivraj et al., 2006; Bertina et al., 1994; Rai et al., 2001; Younis et al., 2000
APC resistentsus	-	-	3	39	Sarig <i>et al.</i> , 2002
Protrombiin	G20210A	-	2 - 4	2	Jivraj et al., 2006; Poort et al., 1996
MTHFR	C677T	Ala→Val	32	32	Jivraj et al., 2006; Frosst et al., 1995

APC- Aktiveeritud proteiin C

MTHFR- metüleentetrahydrofolaatreduktaas

Aktiveeritud proteiin C (APC) resistentsus on 95%-l juhtudest seotud Leideni mutatsiooniga. APC inhibeerib proteiin S-ga faktoreid V ja VIII ja seega toimib hüübimise inhibiitorina (Joonis 3) (Bertina *et al.*, 1994). APC resistentsust esineb 39% korduva spontaanabordiga naistel ning 3% viljakatel naistel (Sarig *et al.*, 2002). APCR esineb ilma faktor V Leideni mutatsioonita 18% KRK patsientidel.

Vere hüübimiskaskaadi viimast proteolüütilist reaktsiooni katalüüsib seriinproteaas trombiin. Selle tulemusel moodustub fibrinogeenist fibriin, mis moodustab vereklompide suurema osa (Joonis 3) (Gehring *et al.*, 2001). **Protrombiini (faktor II) mutatsiooni G → A 20210** positsioonis tõstab veenitrombi riski 2,8 korda (Poort *et al.*, 1996). Selle polümorfismi kandjatel on tunduvalt kõrgem protrombiini tase kui normidel (GG genotüübiga keskmine 1.05 U/mL; AG 1.32 U/mL; $P < 0.001$). Kõrge protrombiini tase on ka trombofiilia riskifaktoriks (Poort *et al.*, 1996). Faktor II polümorfismi alleelisagedus on 2% üldpopulatsioonist (Rosendaal *et al.*, 1998) ning selle kandjatel on 2-8 korda suurem risk korduvaks raseduse katkemiseks (Kovalevsky *et al.*, 2004; Pihusch *et al.*, 2001).

Homotsüsteiin on sulfhüdrüülaminohape, mis tekib metioniini metabolismis. Homotsüsteiini kõrget taset (hüperhomotsüsteineemiat) on seostatud trombofiiliahäiretega (Lane ja Grant, 2000). Homotsüsteiini remetülatsiooniks metioniiniks on 2 rada, üks neist hõlmab **metüleentetrahydrolaatreduktaasi (MTHFR)**. Polümorfism C → T positsioonis 677 *MTHFR* geenis muudab aminohappe alaniini valiiniks (Tabel 2), mille homosügootidel on ensüümi aktiivsus 30% alaniini homosügooti aktiivsusest (Frosst *et al.*, 1995). Heterosügootidel on *MTHFR* efektiivsus 65% alaniini homosügootidest (Frosst *et al.*, 1995) ning selle polümorfismi kandjatel on tõusnud plasma homotsüsteiini tase. KRK naistel esineb *MTHFR* polümorfismi 32%-l (Jivraj *et al.*, 2006) ning ühtlasi esineb 2-3 korda rohkem *MTHFR* polümorfismi suhtes homosügootseid kandjaid (Blumenfeld ja Brenner, 1999).

Kuigi korduva spontaanabordiga on peamiselt seostatud Faktor V Leideni, protrombiini ja *MTHFR*-i mutatsiooni, on tulemused sageli vastukäivad ning arvatakse, et trombofiilsed mutatsioonid on probleemiks eelkõige hilisemate katkemiste puhul (Robertson *et al.*, 2005).

1.3. Trombofiilne faktor annexin A5

Uue KRK trombofiilse riskifaktorina on välja pakutud annexin A5-te (Bogdanova *et al.*, 2007), mille funktsioon on oluline just varajase raseduse käigus ning mis kuulub anneksiinide perekonda. Anneksiinid kuuluvad homologsete vees lahustuvate valkude superperekonda, mis seonduvad negatiivselt laetud fosfolipiidide kaudu membraanidega Ca^{2+} sõltuvalt

(Seaton, 1996). Anneksiine on üle 160 erineva valgu ning neid leidub rohkem kui 65 erinevas liigis (Gerke ja Moss, 2002). Anneksiin A1, A2, A4, A6 ja A7 vahendavad membraani vesiikulite agregatsiooni, A1, A2 ja A6 on tsütoskeleti siduvad valgud ning arvatakse, et nad võivad osa võtta membraani-tsütoskeleti dünaamika regulatsioonist (Gerke ja Moss, 2002). Anneksiin A7 katalüüsib GTP hüdrolyüüsi (Caohuy *et al.*, 1996). Anneksiin A1 on põletikuvastaste glükokortikoidide rakumediaator, A2 arvatakse mängivat antitrombootilist rolli endoteeli raku pinnal (Gerke ja Moss, 2002). Anneksiin A5-l on samuti antitrombootiline roll, mille häirumine võib viia hüübimis-seoseliste haigusteni. Ta moodustab molekulaarse kilbi platsenta hatu apikaalsele pinnale, kaitses rasedust hüübimisfaktorite eest (Gerke ja Moss, 2002).

1.3.1. ANXA5 funktsioon

Annexin A5 asub ema ja loote kokkupuutepunktis ning talle on peamiselt omistatud antikoagulandi rolli. *Annexin A5* ekspresseerub inimese süntsütotrofoblasti apikaalsel pinnal, mis piirneb platsentavillidega (Rand *et al.*, 1994). Fosfatidüülseriini sisaldavad membraani kaksikkihtidel on *annexin A5* trimeerid Ca^{2+} sõltuvalt moodustanud kahedimensioonilise kristalli (Mosser *et al.*, 1991; Pigault *et al.*, 1994), mis pikendab märgatavalt fosfolipiidsõltuvaid vere hüübereaktsioone (Rand, 2000). *Annexin A5* vähendab rakupinnal esitletud fosfatidüülseriini hulka, mis on signaaliks fagotsüütidele, ja lükkab apoptoosi edasi doosist sõltuvalt (Gidon- Jeangirard *et al.*, 1999).

Lisaks on *annexin A5* võimeline seonduma ekstratsellulaarse maatriksi kollageen tüüp II ja tüüp X-ga (von der Mark ja Mollenhauer, 1997). Membraanile seondudes on *annexin A5* monomeer kumera kujuga ning trimeer võib indutseerida invaginatsiooni ja arvatakse, et see on fosfatidüülseriin-*annexin A5* vahendatud pinotsütootiline rada (Kenis *et al.*, 2004).

1.3.2. Annexin A5 roll haiguste kujunemisel

1.3.2.1. Muud haigused

Hetkel pole polümorfisme anneksiinide geenides kirjeldatud ühegi haiguse põhjustajana, kuid on tõendeid, et muutused ekspressioonis, omadustes või anneksiinide lokalisatsioonis võivad anda oma panuse haiguste väljakujunemisele (Gerke ja Moss, 2002). Annexin A5 funktsioonide spekter on lai ning seetõttu on temaga seostatud hulgaliselt erinevaid haiguseid.

Hiljuti tehtud uuring seostas ANXA5 polümorfisme ülekaalulisusega Korea populatsioonis (Seok *et al.*, 2013) ning *in vitro* on annexin A5 interakteerunud polütsüstiin I-

ga, mis on peamine häiritud valk autosomaalse dominantse polütsüstilise neeru puhul. Kahjuks ei ole leiu tähtsust *in vivo* veel uuritud (Markoff *et al.*, 2007).

ANXA5 geeniekspressiooni häirumist on kirjeldatud mitme haiguse puhul. *Annexin A5* tase on tõusnud südame puudulikkuse (Song *et al.*, 1998) ja melanoomivähi ning alanenud leukeemia (Gerke ja Moss, 2002) ja tüüp I diabeedi puhul (Bakar *et al.*, 2014). Süsteemse luupus erütematoosuse patsientidel on oluliselt vähem annexin A5-te siduvaid mikropartikleid (Nielsen, 2012).

Lisaks on annexin A5 sobiv markeriks Alzheimeri tõve ja Lewy kehakestega dementsuse puhul (Yamaguchi *et al.*, 2010; Sohma *et al.*, 2013).

1.3.2.2. *ANXA5* seos raseduspatoloogiatega

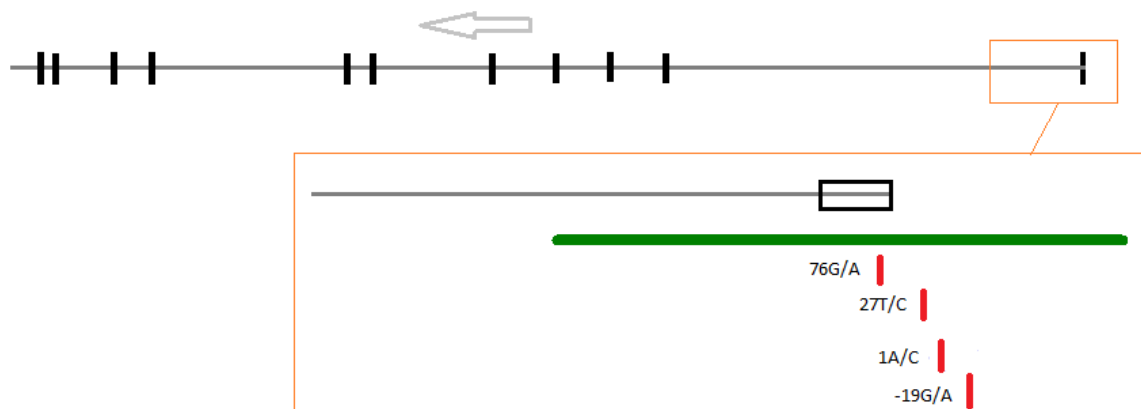
Annexin A5 funktsiooni häirumist on seostatud mitmete raseduspatoloogiatega. Hiire mudelil on tõestatud, et annexin A5 seondumine koagulatsiooni soodustavatele pindadele on kriitilise tähtsusega platsenta verevoolu ning ka loote elujõulisuse jaoks (Wang *et al.*, 1999). Antiannexin A5 antikehade esinemine vähendas annexin A5 hulka trofoblastil ning põhjustasid platsenta trombe, nekroosi ja loote surma (Wang *et al.*, 1999).

Ekstratsellulaarse annexin A5 puhul pakutakse välja antikoagulandi rolli. Annexin A5 2D oligomeerid moodustavad kaistva kristallkihi raku pinna fosfolipiididele, mis varjavad neid hüübimise kaskaadis (Rand, 2000). On leitud, et annexin A5 ekspresseerub kõrgelt süntsüütiotrofoblasti mikrovillide pinnal (Krikun *et al.*, 1994). Süntsüütiotrofoblasti membraanid esitlevad fosfatidüülseriini ning *annexin A5* eemaldamisel antifosfatidüülseriini antikehaga suureneb protrombiini seondumine (Vogt *et al.*, 1997). Antifosfolipiidsündroomi puhul sisaldab patsientide seerum tihti autoantikehi fosfolipiidide, β_2 -glükoproteiin-I ja annexin A5 vastu (Gerke *et al.*, 2005), mis ilmselt lõhuvad anneksiin A5 kaitsvat kihti ning põhjustavad vere koaguleerimist. Samuti on kirjeldatud antifosfolipiidsündroomiga patsientide platsentades vähenenud annexin A5 valgu ekspressiooni (Rand *et al.*, 1994).

Pre-eklampsia korral on *annexin A5* ekspressioon langenud ning korreleerus vere hüübimise aktivatsioonimarkerite tõusuga (Shu *et al.*, 2000). Samuti on kirjeldatud pre-eklampsia platsentades *ANXA5* geeniekspressiooni vähenemist 1% normist, kuid valgu tase on 65% normist (Gourvas *et al.*, 2014). Ema veres on valgu tase samuti alanenud (Xin ja Wang, 2011). Vähenenud *annexin A5* ekspressiooni on näidatud ka loote kasvupeetuse korral (Sifakis *et al.*, 2010). Lisaks on *ANXA5* geenivariante seostatud kõrgeenenud polütsüstiliste munasarjade sündroomiga (Rogenhofer *et al.*, 2013).

1.3.3. ANXA5 geneetiline varieeruvus korduva spontaanabordi puhul

Kuna ANXA5-l on oluline roll platsentas ja varajases raseduses, siis on ANXA5 pälvinud tähelepanu kui just varajaste korduvate katkemiste kandidaatgeen. Bogdanova *et al.*, 2007 uuris ANXA5 kodeerivat järjestust koos 80 bp külgnevate intronitega ning promootorregiooniga ning tuvastas ANXA5 geeni promootorist 4 ühenukleotiidsed polümorfismi (SNP-d) (-19G/A, 1A/C, 27T/C ja 76G/A), mida seostati KRK esinemisega (Joonis 4). Nende 4 SNP põhjal tuvastati 3 haplotüüpi: *wild type* (kõik mažoorssed alleelid neljas positsioonis – GATG); M1 (vahepealne – GCCG) ja M2 (kõik minoorssed alleelid – ACCA). M2 esines 14,3% patsientidest ja 5,1% kontrollidest ning haplotüübi kandjatel on 2,4 korda suurem risk korduvaks raseduse katkemiseks kui mittekandjatel ning 3,8 korda suurem risk võrreldes viljakate kontrollidega (Bogdanova *et al.*, 2007).



Joonis 4. ANXA5 geeni struktuur. Noolega on näidatud transkriptsiooni suund. Mustade püstkriipsudega on märgitud eksonid. Mittetransleeritav esimene ekson on musta ristküliku sees. Rohelisega on märgistatud CpG saar. Punaste püstkriipsudega on märgistatud Bogdanova *et al.*, 2007 ANXA5 promootorist tuvastatud SNP-d. Polümorfismide positsioon on antud esimese transkriptsiooni saidi suhtes (Carcedo *et al.*, 2001).

Järgnevad uuringud on samuti kirjeldanud M2 haplotüübi kõrgemat esinemissagedust KRK patsientidel võrreldes kontrollgrupiga nii Euroopas kui Aasias. Rogenhofer *et al.*, 2012 uuringus esines M2 haplotüüpi 16,7% Saksamaa patsientidest ja 8,3% kontrollidest ning M2 haplotüübi kandjatel risk korduvaks spontaanabordiks 1,7 korda kõrgem. Itaalia KRK patsientidel on M2 haplotüübi kandjatel 2,8 korda suurem risk korduvaks raseduse katkemiseks kui mittekandjatel ja loote kasvupeetuse grupil tõusis risk 5,5 korda (Tiscia *et al.*, 2009). Jaapani KRK patsientidel oli M2 kandjaid 1,9 korda rohkem kui kontrollidel ning Bulgaarias 1,5 korda (Miyamura *et al.*, 2011; Tüttelmann *et al.*, 2013).

Teine uuring Jaapanis aga ei kinnitanud M2 suuremat sagedust patsientidel võrreldes kontrollidega ning ANXA5 riskialleeli ei leitud piisavalt usaldusväärseks kliiniliseks

ennustajaks raseduse tulemuslikkusel (Hayashi *et al.*, 2013). Samuti ei leitud erinevusi Hiina KKK patsientide ja kontrollide *ANXA5* G76A alleelisagedustes Cao *et al.*, 2013 töös (vastavalt 12,2% ja 14,2%).

In vitro katsete tulemused on viidanud, et M2 haplotüübi puhul on promootori aktiivsus vähenenud 37-42%-ni normist (Bogdanova *et al.*, 2007). Väiksemat ekspressiooni taset M2 kandjatel on samuti kirjeldatud pre-eklampsia patsientide platsentas. Chinni *et al.*, 2009 tuvastas pre-eklampsia M2 haplotüübiga patsientidel kolm korda madalama mRNA ekspressiooni kui kontrollidel ning M2 haplotüübi kandjatel kaks korda väiksemat ekspressiooni taset kui mittekanjatel.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgiks on analüüsida varasemalt Bogdanova *et al.* 2007 poolt publitseeritud *ANXA5* promootori riskihaplotüübi seost raseduse katkemistega Eesti ja Taani valimites:

- 1) *ANXA5* promootoris esinevate SNP-de ja haplotüüpide tuvastamine Eesti korduva raseduse katkemisega valimis
- 2) Tulemuste replitseerimine Taani korduva raseduse katkemise valimis
- 3) Tuvastatud SNP-de ja haplotüüpide esinemissageduste võrdlev analüüs maailmas avalike andmebaaside (*1000 genomes*) ja KORA andmestiku põhjal

2.2. Materjal ja metoodika

Tabel 3. Tööskeem.

Eesti valim	Verest DNA eraldamine	
	PCR ja sekveneerimine	<i>ANXA5</i> promootori amplifitseerimine
		Polümorfismide tuvastamine PCR produkti sekveneerimise teel
	Andmete statistilis-geneetiline analüüs	Tuvastatud SNP-de alleelisageduste, genotüüpide ja Hardy-Weinbergi tasakaalu määramine
		Haplotüüpide, haplotüübiblokkide ja –võrgustike analüüs
		SNP-de ja haplotüüpide võrdlus KORA ja 1000 genoomi andmestikuga
	Restriktsioon	Varasemalt kirjeldatud <i>ANXA5</i> promootori riskihaplotüübi esinemise eksperimentaalne valideerimine
Taani valim	Tulemuste replitseerimine	<i>ANXA5</i> promootori amplifitseerimine
		Varasemalt kirjeldatud <i>ANXA5</i> promootori riskihaplotüübi määramine restriktsiooniga

2.2.1. Valim

Käesolev töö on Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee ja Kopenhaageni Rigshospitaleti viljakuskliiniku eetikakomitee poolt heaks kiidetud. Eesti valim on kogutud aastatel 2003-2007 Tartu Ülikooli Naistekliinikus ja Nova Vita Kliinikus, mis on lastetuse ravi ja meditsiinigeneetika keskus Tallinnas (koordineeritud Dr. K. Rulli poolt). Taani valimit on kogutud aastast 1986 Taani korduva raseduse katkemise kliinikutes Kopenhaagenis ja Aalborgis (koordineeritud Dr. Ole B. Christianseni poolt). Iga uuringus osaleja on andnud kirjaliku informeeritud nõusoleku. Varasemalt on Eesti ja Taani valimit kasutatud paralleelselt edukalt järgnevates töödes: Nagirnaja *et al.*, 2012 ja Rull *et al.*, 2013.

KRK patsiendiks loeti naisi, kellel on esinenud kolm või enam raseduse katkemist enne 22. gestatsiooninädalat. Patsiente oli Eesti valimis 86 ja Taanis 227 (Tabel 4). Kõigil patsientidel on välistatud teadaolevad korduva raseduse katkemise riskifaktorid, näiteks antifosfolipiidsündroom, Faktor V (Leiden) ja Faktor II (protrombiin) mutatsioonid. Kõigil patsientidel oli normaalse pikkusega menstruatsioonitsükkel ja normaalne karüotüüp, mis määrati perifeerse vere lümfotsüüdi kultuurist. Ultraheli või hüsteroskoopiaga tuvastatud emaka anomaaliatega naispatsiendid arvati uuringust välja.

Kontrollgrupi naistel pole varasemalt esinenud raseduse katkemist ja neil on vähemalt 2 (Taani) või 3 (Eesti) elussünnitusega lõppenud rasedust. Antud grupis oli 100 Eesti ja 115 Taani naist (Tabel 4).

Tabel 4. Käesolevas töös kasutatud valimi iseloomustus.

Populatsioon	Valimi grupp	Indiviidide arv	Vanus aastates*
			Mediaan (min-maks.)
Eesti	Patsiendid	86	30 (19-41)
	Kontrollid	100	32 (21-43)
Taani	Patsiendid	227	30 (19-43)
	Kontrollid	115	30 (22-38)

min – miinimum, maks – maksimum

* Vanust arvestati kolmanda raseduse katkemise hetkel patsientidel ja teise (Taani) või kolmanda (Eesti) sünni hetkel kontrollidel

2.2.2. DNA eraldamine

Eesti valim koosnes 73 patsiendi ja 100 kontrolli DNA-st, mis olid hoiustatud Inimese molekulaargeneetika uurimisgrupi labori biopangas. Lisaks olemasolevale biopangale, eraldas inimese täisverest juurde 13 patsiendi DNA-d.

Inimese genoomset DNA-d eraldati verest, mida hoiti -80°C juures. Külmunud vered soojendati toatemperatuuril. Vastavalt vere kogusele pipeteeriti veri 25ml või 50ml tuubi. Lüüsi etapid tehti jääl. Järgnevad kogused on 1 ml vere kohta. Verele lisati 4 ml puhvrit A (Tabel 5). Vere ja puhvri korralikuks segunemiseks loksutati tuubi õrnalt. Saadud segu tsentrifuugiti 30 min 4°C ja 1942 RCF (*relative centrifugal force*) juures. Supernatant valati hoolikalt ära ning tuub keerati ümber, et välja nõrutada ka viimane puhvri jääk. Vajadusel korrati eelnevat lüüsi etappi. Järgmises pesuetapis lisati 2 ml puhvrit A. Sade loksutati põhjast lahti ning tsentrifuugiti 20 min 4°C ja 1942 RCF juures. Supernatant valati ära, nõrutati ning sademele lisati 0,9 ml puhvrit B (Tabel 5). Sade toksiti lahusesse. Tilkhaaval lisati 100 µl puhvrit C (Tabel 5) ja segu inkubeeriti üleöö loksutil 37°C juures. Järgmisel päeval lisati 270 µl küllastatud NaCl lahust. Tuubi raputati tugevalt 15 sek ning tsentrifuugiti toatemperatuuril 30 min 3452 RCF juures. Supernatant pipeteeriti uude tuubi ning lisati topeltkoguses filtreeritud 96% etanooli. Tuubi keerati segamiseks. Pasteuri pipetiga eemaldati DNA tuubist ning pandi 500 µl TE lahusesse. Eraldatud DNA-d säilitati -20°C juures. Eraldatud DNA-de kontsentratsioonid mõõdeti NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetriga. Genoomse DNA terviklikkust kontrolliti 1% agarosgeelil (0,5x Tris/boorhappe/EDTA (TBE)).

Tabel 5. Kasutatud puhvrite koostis.

Puhver A	Puhver B	Puhver C
10,95 % sahharoosi	400mM NaCl	10% SDS
1mM Tris-HCl	2mM EDTA	2mg/ml Proteinaas K
5mM MgCl ₂	10mM Tris-HCl	
1% Triton X-100		

2.2.3. ANXA5 promootoriaala amplifikatsioon

ANXA5 promootori sekveneerimiseks ja SNP-de tuvastamiseks Eesti valimis on kasutatud praimeripaari I. PCR produkti pikkuseks oli 570 aluspaari (Tabel 6, Joonis 5). Sekveneerimisel kasutasin praimeerit A5-seq (Tabel 6, Joonis 5). ANXA5 promootorist riskihaplotüübi M2 tuvastamiseks restriksiooni teel kasutasin praimeripaari II. Amplifikatsiooni tulemusel oli produktiks 294 aluspaariga DNA (Tabel 6, Joonis 5).

```

          PCR I-reverse
-101 tcgcctccaa aaagacgccc acgcactatg ttgagcacc aagtgaggct
-51 acggttctctg cggtcacaga gggcagggag gctcaagcac ctccaaaacc
  1  ccgagccctg gacagctccc caggcccttc ccgcggcgcg aggacaagag
  51 gtctccgggg ccttcggggg agcggcgctt cctcttggtt ccagcagctc
101 tgcggccgct cccaccccag gcccgcgaga ccagcgggac agtccgcgcc
          PCR II-reverse
151 gcgggagacc aactgggacg agccgcgacc cacgcaggcg cgctgaggcc
201 ggggcagggg cgggcccggc tggcgcggcc ggctgcggt tggggcctg
          -19G>A
          1A>C Tsp          27T>C
251 gcgggggttg gacgggccaa gccgggcagG GCCGGGGTGG GGCCGCTGGC
          76G>A BamHI
301 GTTTCGGTTG CTTGGATCAG TCTAGGTGCA GCTGCCGGAT CCTTCAGCGT
351 CTGCATCTCG GCGTCGCCCC GCGTACCGTC GCCCGGCTCT CCGCCGCTCT
          PCR II-forward
401 CCCGGGGGTT CGGGGCACTT GGGTCCACA GTCTGGGTga gtgggtccag
A5-seq PCR I-forward
451 cccgggggagg gggctccttc tggagaggag agcgtggtcg cggggc

```

Joonis 5. *Annexin A5* geeni analüüsitud promootorregiooni iseloomustus. Järjestus on transkriptsiooni suunas, *ANXA5* kodeeritakse *reverse* ahelalt. Nummerdatud on esimese transkriptsiooni algussaidi järgi, mille asukoht (tsp) ja transkriptsiooni suund on näidatud laia noolega (Carcedo *et al.*, 2001). Mittetransleeruv ekson 1 on märgitud suurte tähtedega. Bogdanova *et al.*, 2007 artiklis leidsid *ANXA5* promootoris M2 riskihaplotüübi, mille moodustavad 4 järjestikuse SNP minoorsed alleelid: -19G>A (rs112782763), 1A>C(rs28717001), 27T>C(rs28651243) ja 76G>A (rs113588187). Need 4 SNP-d on joonisel *Bold*-iga välja toodud ja alla joonitud. Praimeripaar I ja II on alla joonitud ning nende nimed on järjestuste kohale kirjutatud. BamHI restriksioonisaite on tähistatud kastiga. BamHI lõikab GG vahel ning jätab kleepuvad otsad. Hallil taustal on sekveneerimispraimeri järjestus.

Tabel 6. Eesti valimi PCR-s kasutatud praimeripaaride iseloomustus.

Praimerite kombinatsioonid	Praimeri nimi	Praimeri järjestus 5'-3'suunas	Produkti pikkus
Praimeripaar I	PCR I- <i>forward</i>	ACCACGCTCTCCTCTCCAG	570 bp
	PCR I- <i>reverse</i>	CCACGCACTATGTTGAGCAC	
Praimeripaar II	PCR II- <i>forward</i>	CGACCACTCACCCAGACTGT	294 bp
	PCR II- <i>reverse</i>	GGAGACCAACTGGGACGA	
Sekventsipraimer	A5-seq	TGGTCGCAGCCCCGGGG	

2.2.3.1. PCR Eesti valimile I praimeripaariga

PCR-i reaktsioonisegu mahuga 25µl sisaldas 1x puhvrit B2 (Solis Biodyne), 2,5mM MgCl₂, 0,25mM dNTP segu, 0,4pmol/µl PCR I-*forward* ja PCR I-*reverse* praimerit (Microsynth) (Tabel 6, Joonis 5), 1U Hot Firepoli polümeraasi (Solis Biodyne), 1,2M betaiini (Sigma-Aldrich) ja 100ng genoomset DNA-d.

PCR viidi läbi Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 2700 masinaga järgmistel tingimustel:

Algne denaturatsioon	95°C	15 min	
Denaturatsioon	95°C	20 sek	10 tsüklit
Praimerite seondumine	65°C*	30 sek	
Ekstensioon	72°C	1 min	
Denaturatsioon	95°C	20 sek	10 tsüklit
Praimerite seondumine	52°C	30 sek	
Ekstensioon	72°C	1 min	
Denaturatsioon	95°C	20 sek	20 tsüklit
Praimerite seondumine	49°C	30 sek	
Ekstensioon	72°C	1 min	
Inkubatsioon	72°C	10 min	
Säilitamine	10°C	∞	

* -1°C tsükli kohta

PCR produktide olemasolu kontrolliti 1,5% agarosgeelil (0,5x TBE)

2.2.3.2. PCR Eesti ja Taani valimile II praimeripaariga

PCR-i reaktsioonisegu mahuga 25µl sisaldas 1x puhvrit B2 (Solis Biodyne), 2,5mM MgCl₂, 0,25mM dNTP segu, 0,4pmol/µl PCR II-*forward* ja PCR II-*reverse* praimerit (Metabion) (Tabel 6, Joonis 5), 1U Hot Firepoli polümeraasi (Solis Biodyne), 1M betaiini (Sigma-Aldrich) ja 50-100 ng genoomset DNA-d.

PCR viidi läbi Applied Biosystems Thermal Cycler 2720 masinaga järgmistel tingimustel:

Algne denaturatsioon	95°C	15 min	
Denaturatsioon	95°C	30 sek	10 tsükli
Praimerite seondumine	66°C*	30 sek	
Ekstensioon	72°C	30 sek	
Denaturatsioon	95°C	30 sek	30 tsükli
Praimerite seondumine	56°C	30 sek	
Ekstensioon	72°C	30 sek	
Inkubatsioon	72°C	10 min	
Säilitamine	10°C	∞	

* -1°C tsükli kohta

PCR produktide olemasolu kontrolliti 2,5% agarosgeelil (0,5x TBE).

2.2.4. Eesti valimi sekveneerimine

PCR produktidele lisati 1,5µl exo-SAP reaktsioonisegu, mis koosnes 0,5x puhvrist eksonukleas I jaoks (Thermo Scientific) ja 1,4U *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) (Fermentas).

PCR produktid inkubeeriti järgnevatel tingimustel:

37°C	20 min
80°C	15 min
4°C	∞

Järgnevalt segasin jääl kokku BigDye Terminator kiti (Applied Biosystems) sekveneerimisreagentid kogumahu 10µl: 0,75x lahjenduspuhvrit, 0,75 µl Premixi. Lisasin juurde 0,2pmol/µl sekventsipraimerit A5-seq (Tabe 6, Joonis 5) ja 2µl exo-SAP töötuse läbi teinud PCR produkti.

Sekveneerimise reaktsioonid inkubeeriti järgmistel tingimustel:

Algne denaturatsioon	96°C	1 min	} 25 tsüklit
Denaturatsioon	96°C	10 sek	
Praimeri seondumine	50°C	5 sek	
Ekstensioon	60°C	4 min	
Inkubatsioon	10°C	7 min	
Säilitamine	10°C	∞	

Pärast reaktsiooni lõppu säilitati proove -20°C juures.

Sekveneerimisreaktsioonide sadestamiseks lisati reaktsioonile 1µl 10M ammooniumatsetaati ja 0,5µl dekstraani. Segu segati korralikult läbi ning fuugiti põhja. Lisati 30µl 96% külma etanooli ja proovid segati uuesti läbi. Reaktsioonisegu pandi -20°C juurde 15-20 minutiks sadenema ning seejärel fuugiti proove 15 min 4°C 13 000 RCF juures. Järgnevalt eemaldati supernatant ning lisati 200µl 70% külma etanooli. Fuugiti uuesti 10 min 13 000 RCF juures. Eemaldati supernatant ja proovid jäeti 37°C juurde 0,5-1h, et üleliigne etanool saaks aurustuda. Sekveneerimisreaktsioonid võeti üles 10µl 70% formamiidis.

DNA sekveneerimist teostas Eesti Biokeskuse ja Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi DNA genotüpiseerimise ja sekveneerimise tuumiklabor.

2.2.5. Restriktsioon

Restriktsiooni reaktsioonisegu mahuga 10µl sisaldas 5-7µl PCR produkti, 0,1µl BamHI puhvrit (Fermentas) ja 5U BamHI ensüümi (Fermentas, Thermo Scientific). Proovid inkubeeriti üleöö 37°C juures. Restriktsiooni tulemust kontrolliti 2,5% agarosgeelil (0,5xTBE).

2.2.6. Andmete statistiline analüüs

2.2.6.1. Polümorfismide tuvastamine

Sekveneerimisel saadud DNA järjestuste kvaliteeti kontrollisin visuaalselt Bioedit-iga v 7.1.9 (Hall, 1999). Halva kvaliteediga proovid sekveneeriti uuesti.

ANXA5 promootori sekveneerimisel saadud järjestused joondati ja assambleeriti programmiga Phrap, polümorfisme skaneeriti PolyPhred-i versioon 6.02-ga ning analüüsiti

kasutades Consed-i versiooni 19.0 (Gordon, 2003). PolyPhred-i tuvastatud võimalikud heterosügootsed positsioonid kontrolliti ja kinnitati käsitsi.

Populatsioonisiseseid erinevusi analüüsisin SNP-dest vabavaralise programmiga Genepop versioon 4.1.4. (Raymond ja Rousset, 1995). Hardy-Weinbergi tasakaalu ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$) kontrollimiseks kasutasin *Probability* testi. Parameetrid olid järgnevad: *dememorization number* – 1000, *number of batches* – 100, *number of iterations per batch* – 1000. Oluliseks P-väärtuseks lugesin $P < 0,05$.

Indiviidide genotüüpide infot 5-s SNP positsioonis analüüsisin Haploview-ga, versioon 4.2. (Barrett *et al.*, 2005). Tegin geneetilise aheldatuse mittetasakaalulisuse ja haplotüübiblokkide analüüsi kasutades vaikimisi seatud parameetreid. *Singletonid* jäeti analüüsist välja.

2.2.6.2.Haplotüüpide tuvastamine

Haplotüüpide määramiseks populatsiooni genotüübi andmestikust kasutasin programmi PHASE versiooni 2.1. (Stephens *et al.*, 2001 ja Stephens *et al.*, 2005). PHASE programmi parameetrid olid järgnevad: tsüklite arv – 1000; *thinning interval* – 1; *burn-in* – 100. Valimis ainult ühel kromosoomil esinenenud haruldased SNP-d (*singletonid*) jäeti analüüsist välja.

PHASE-i tuvastatud haplotüüpide põhjal joonistasin ka fülogeneesipuu, kasutades *median joining* algoritmi programmis Network versioon 4.612 (Bandelt *et al.*, 1999).

Bogdanova *et al.*, 2007 poolt kirjeldatud riskihaplotüübi olulisust patsientide ja kontrollide vahel analüüsisin GraphPad Prism 5 programmiga kasutades Fisheri täpset testi.

2.2.6.3.Võrdlus andmebaasidega

ANXA5 geenis esinevate SNP-de ja haplotüüpide võrdlevaks analüüsiks populatsiooni-põhiste kohortidega on genotüpiseerimise andmestik saadud 1000 Genoomi Projektist (The 1000 Genomes Project Consortium, 2012). Eesti valimis tuvastatud *annexin A5* SNP-de genotüübid Euroopa, Jaapani ja Hiina populatsioonides on võetud rs koodi alusel *1000 genomes* kodulehelt (<http://browser.1000genomes.org/index.html>). Individuaalsete genotüüpide andmed analüüsiti PHASE-i ja Haploview-ga nagu eelpool kirjeldatud.

Lisaks on võrdlev SNP info saadud Lõuna-Saksamaa kohta KORA biopanga S3 andmestikust (Wichmann *et al.*, 2005). KORA S3 valim on kogutud 1994.-1995. aastal Augsburgi piirkonnast, omavahel mittesuguluses olevast üldpopulatsioonist Lõuna-Saksamaal. Valim koosnes 1644 Euroopa päritolu indiviidist, vanuses 25-69 aastat. S3 valimile tehti 10 aastat hiljem 2003-2004 järeluuring, mille käigus vastasid indiviidid

küsimustikele ning kontrolliti suremust. S3 valimile tehti üle genoomi genotüpiseerimine. *ANXA5* promootorist tuvastatud SNP-de alleelisagedused on arvutatud imputeeritud andmetest. Haplotüüpide jaotust ei ole võimalik ennustada imputeeritud KORA andmestiku puhul.

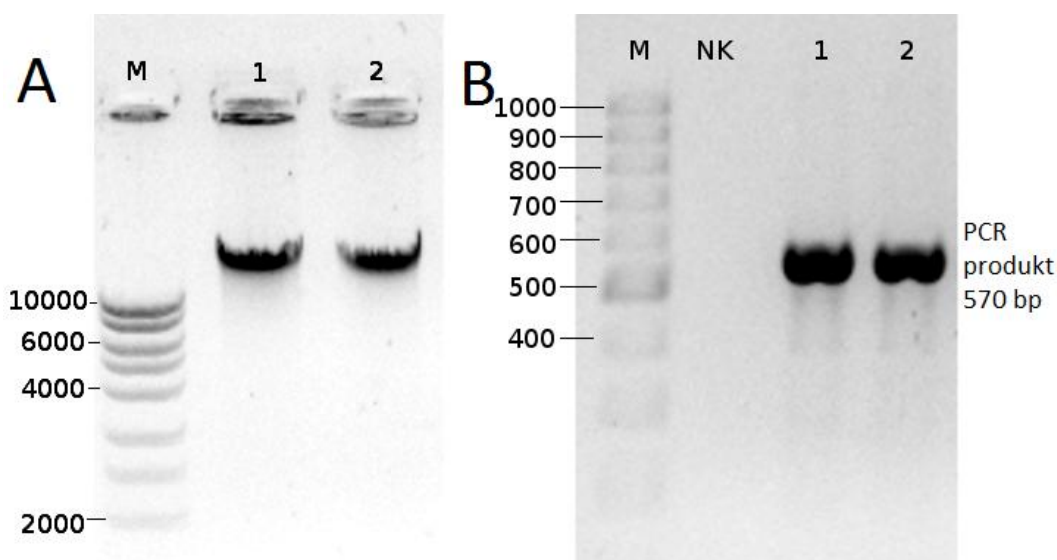
2.3. Tulemused

2.3.1. *ANXA5* promootori analüüs Eesti valimis

2.3.1.1. DNA eraldamine ja *ANXA5* promootori amplifikatsiooni tulemus

Minu poolt eraldatud 13 KKK patsiendi DNA saagis oli keskmiselt 62,9 ug, A260/A280 puhtus 1,82 (Pilt 1.A).

SNP-de tuvastamiseks *ANXA5* promootorist tegin praimeripaariga I PCR-i 86 patsiendile ja 100 kontrollile (Pilt 1.B). Saadud PCR-i produktid sekveneeriti.



Pilt 1. Geelektroforeesi tulemused. A. Verest eraldatud DNA-de terviklikkuse kontroll 1% agarosgeelil (0,5x TBE). Kasutati MassRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific) markerit (M). B. Praimeripaariga I tehtud PCR-i tulemus geelektroforeesil (1,5% 0,5x TBE). Pildil on näha GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) marker (M), negatiivne kontroll (NK) ja kaks patsienti.

2.3.1.2. Polümorfismide tuvastamine

Sekveneerimise teel tuvastas Eesti valimis *ANXA5* promootoralas kokku 7 SNP-d (Tabel 7). Neist 5 polümorfismi on sagedased (minoorse alleeli sagedus >5%) ning varasemalt raporteeritud dbSNP andmebaasis. Kaks SNP-d on kirjeldatud esmakordselt ning on harvaesinevad. Need SNP-d esinesid valimis ühel kromosoomil erinevatel patsientidel (Tabel 7).

Varasemalt publitseeritud artiklites (Bogdanova *et al.*, 2007) esinenud neli järjestikust polümorfismi, mille baasil on tuvastatud M2 riskihaplotüüp, esinevad ka Eesti valimis (SNP-d

-19G/A, 1A/C, 27T/C ja 76G/A) (Tabel 7). Nende SNP-de puhul oli kontrollidel 1,6-2 korda suurem sagedus kui patsientidel.

Tabel 7. ANXA5 promootoris tuvastatud SNP-de alleelisagedused ja Hardy-Weinbergi tasakaalu P-väärtused. Riskihaplotüüp on *Bold*-iga esile tõstetud.

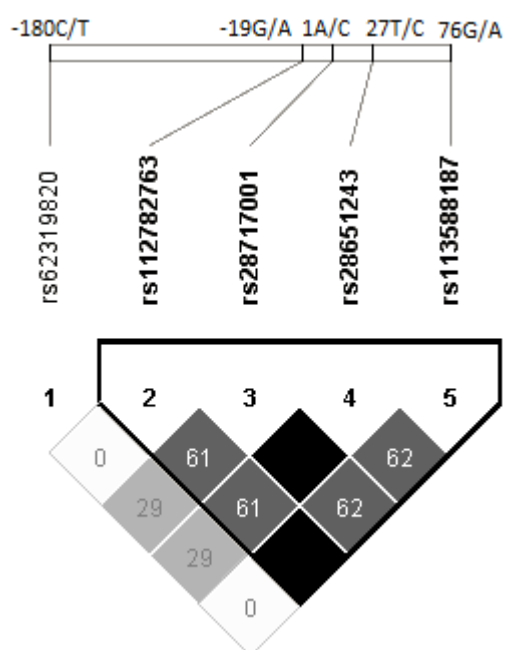
SNP pos.*	Mažoorne/ minoorne alleel	dbSNP ID	Minoorse alleeli sagedus (%)		Hardy-Weinbergi tasakaal (P-väärtus)	
			Kontrollid	Patsiendid	Kontrollid	Patsiendid
-186	C / T	-	-	S	a.p.	a.p.
-180	C / T	rs62319820	6,57	5,23	0,3435	1,0000
-47	C / A	-	-	S	a.p.	a.p.
-19	G / A	rs112782763	15	7,65	0,4547	0,3909
1	A / C	rs28717001	21,72	13,37	0,7731	1,0000
27	T / C	rs28651243	21,72	13,37	0,7731	1,0000
76	G / A	rs113588187	15,15	8,14	0,6913	0,4372

*SNP positsiooni loetakse alates esimesest transkriptsiooni startsaidist (Joonis 5).

S - *singleton*, SNP esineb kogu valimist ainult ühel kromosoomil

a.p. – andmed puuduvad

Kõik ANXA5 promootorist tuvastatud sagedased polümorfismid olid Hardy-Weinbergi tasakaalus (Tabel 7) ning 4 SNP-d 5-st moodustavad ühise geneetilise aheldatuse mittetasakaalulisuse (*linkage disequilibrium*, LD) bloki (Joonis 6).



Joonis 6. Annexin A5 promootorist tuvastatud 5 sagedasema SNP geneetilise aheldatuse mittetasakaalulisuse muster. Esitatud on r^2 LD väärtused.

2.3.1.3. Haplotüüpide tuvastamine

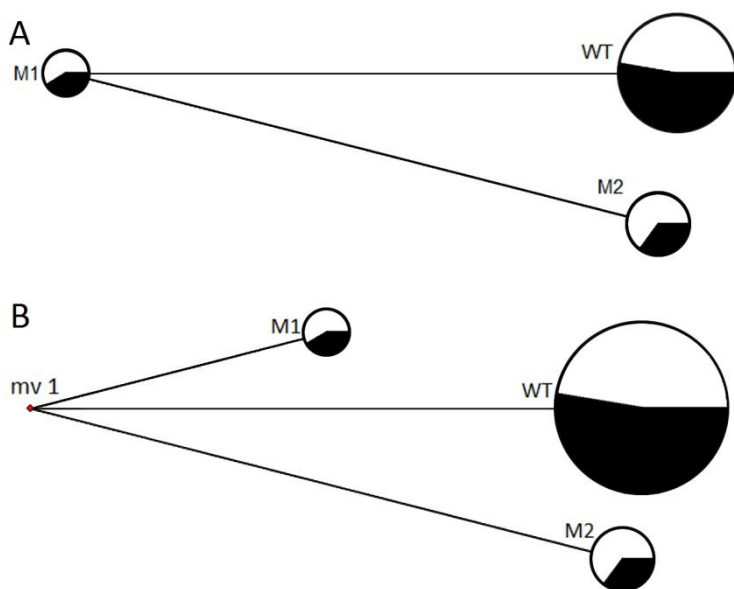
ANXA5 promootoris esinevate haplotüüpide määramine tehti kõigi Eesti valimis tuvastatud 5 sagedase SNP põhjal (-180C/T, -19G/A, 1A/C, 27T/C ja 76G/A) ning 2 *singletoni* jäeti välja. PHASE-i põhjal tuvastasin Eesti valimist kolm haplotüüpi: *wild type* (koosneb mažoorsetest alleelidest – CGATG), M1 (3 minoorset alleeli – TGCCG) ja M2 (4 minoorset alleeli – CACCA) (Tabel 8). *Wild type* haplotüüpi esineb kontrollidel 78% ja patsientidel 86,6% ja M1 kontrollidel 7% ja patsientidel 5,2%. M2 riskihaplotüüpi esineb kontrollidel 15% ja patsientidel 8,1% (Fisheri täpne test, $P = 0,0518$). Kõige rohkem esines *wild type*-i ja kõige vähem M1 haplotüüpi (Tabel 8).

Haplotüüpide tuvastamine PHASE-iga viidi läbi ka 4 SNP põhjal, mis asuvad LD blokis (Joonis 6) ning mille põhjal on varasemalt teostatud KKK assotsiatsiooni uuringuid (Bogdanova *et al.*, 2007). Varasemalt kirjeldatud 4 polümorfismi põhjal määratud haplotüüpide jaotus ei erinenud Eestis 5 SNP põhjal leitudest (Tabel 8).

Tabel 8. Haplotüüpide tuvastamine Eesti valimis 5 ja 4 polümorfismi põhjal. 5 SNP haplotüübid on leitud positsioonide -180C/T, -19G/A, 1A/C, 27T/C ja 76G/A põhjal. 4 SNP haplotüübid positsioonide -19G/A, 1A/C, 27T/C ja 76G/A põhjal. Varasemalt kirjeldatud M2 riskihaplotüüp on märgitud *Bold*-iga (Bogdanova *et al.*, 2007).

Haplotüübi nimi	5 SNP põhjal	4 SNP põhjal	Sagedus valimis (%)	
			Kontrollid	Patsiendid
wt	CGATG	GATG	78	86,6
M1	TGCCG	GCCG	7	5,2
M2	CACCA	ACCA	15	8,1

PHASE-i määratud haplotüüpide põhjal joonistasin 2 fülogeneesipuud. Eesti valimi *ANXA5* promootorist tuvastatud 4 SNP põhjal joonistatud fülogeneesipuul on sõlmpunktiks M1 haplotüüp, mis erineb M2 haplotüübist positsioonides -19 ja 76 ning *wild type* (wt) haplotüübist positsioonides 1 ja 27 (Tabel 8, Joonis 7.A). 5 SNP põhjal joonistatud fülogeneesipuul on sõlmpunktiks mediaanvektor (mv 1). Mediaanvektor on hüpoteetiline (tihti eelkäija) järjestus, mis on vajalik olemasolevate andmete ühendamiseks võrgustikuks maksimaalse parsimoonuse jaoks. Mediaanvektor erineb M1 haplotüübist positsioonis -180, wt-st positsioonides 1 ja 27 ning M2-st positsioonides -19 ja 76 (Joonis 7.B).

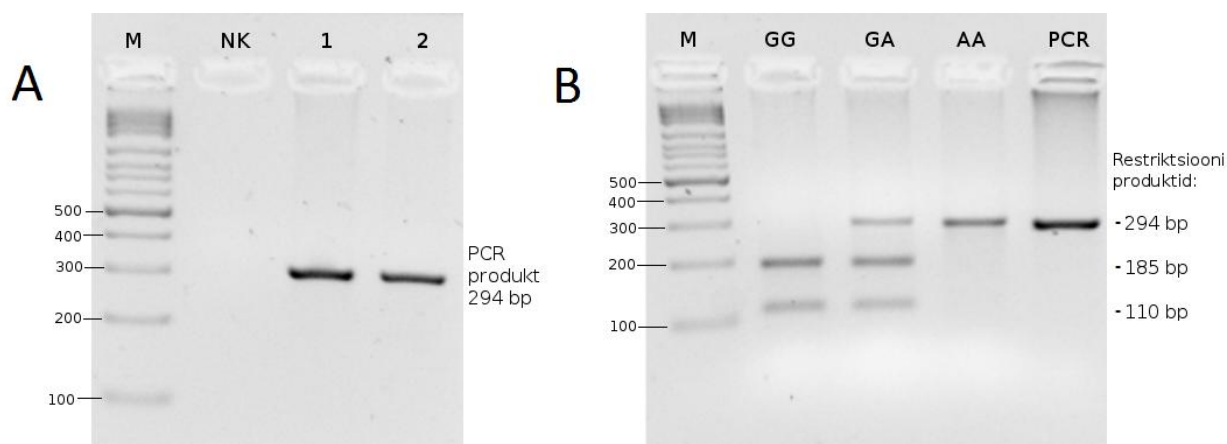


Joonis 7. Programm Network-iga tehtud fülogeneesipuud. **A.** Eesti valimis *ANXA5* promootorist tuvastatud 4 SNP põhjal (Tabel 8) joonistatud haplotüüpide fülogeneesipuu. **B.** *Annexin A5* promootorist tuvastatud 5 polümorfismi põhjal (Tabel 8) joonistatud haplotüüpide fülogeneesipuu. mv1 – hüpoteetiline (tihti eelkäija) järjestus, mis on vajalik olemasolevate andmete ühendamiseks võrgustikuks maksimaalse parsimoonsuse jaoks.

2.3.2. *ANXA5* promootori M2 riskihaplotüübi määramine Eesti ja Taani valimis restriksioon-analüüsi meetodil

2.3.2.1. M2 riskihaplotüübi määramine Eestis

Sekveneerimise ja analüüsi teel määratud M2 haplotüübi sageduse kinnitamiseks kogu Eesti valimis (kokku $n = 186$ indiviidi, Tabel 4), viidi läbi amplifikatsioon II praimeripaariga (Pilt 2.A) ning restriksioon-analüüs. Kuna positsioonis 76 esinev minoorne A alleel on leitav ainult M2 haplotüübis, siis on 76G/A polümorfismi-põhine restriksioon sobilik M2-spetsiifiliseks analüüsiks (Tabel 7,8). BamHI ensüüm lõikab lookuses 76G→A ainult juhul, kui restriksioonisaadis on G. Seega minoorse alleeli homosügooti (AA) puhul ei lõika ensüüm PCR produkti üldse, heterosügooti (GA) olemasolul tekib 3 eri pikkusega produkti (297 bp, 184 bp ja 110 bp), mažoorse alleeli homosügooti (GG) puhul 2 produkti (184 bp ja 110 bp) (Pilt 2.B). Restriksiooni tulemused kinnitasid täielikult sekveneerimise teel saadud andmeid kõikidel Eesti indiviididel.



Pilt 2. Praimeripaar II läbi viidud katsete tulemused 2% agarosgeelil (0,5xTBE). **A.** Praimeripaar II-ga tehtud PCR. Pildil on 100 bp DNA Ladder Ready to Load (Solis Biodyne) marker (M), negatiivne kontroll (NK) ja kaks patsienti. **B.** BamHI ensüümiga läbi viidud restriksioon *ANXA5* promootoris M2 riskihaplotüübi tuvastamiseks. Pildil on 100 bp DNA Ladder Ready to Load (Solis Biodyne) marker (M), üks indiviid, kes ei kanna M2 haplotüüpi (GG genotüüp positsioonis 76G/A), üks M2 suhtes heterosügootne (GA) ning üks M2 suhtes homosügootne (AA) indiviid. Viimasel real on lõikamata PCR-i produkt (294 bp).

2.3.2.2. *ANXA5* riskihaplotüüp Taanis

Eesti valimi põhisele geneetilise assotsiatsiooni uuringule järgnes replikatsiooni uuring. Taani valimis (227 patsienti ja 115 kontrolli) (Tabel 4), mille puhul viidi läbi amplifikatsioon ja M2 spetsiifiline restriksioon sama protokollil alusel nagu Eesti valimi puhul. (Pilt 2.B). Riskihaplotüübi spetsiifiline restriksioon polümorfismi 76G/A põhjal määrati M2 haplotüübi sageduseks Taani patsientidel 9,7% ja kontrollidel 12,6% (Fischeri täpne test, $P=0,1983$) (Tabel 9).

ANXA5 76G/A polümorfism oli Hardy-Weinbergi tasakaalus: patsientidel oli P -väärtus 0,1367 ning kontrollidel 0,6912. Tulemused kinnitavad M2 haplotüübi kõrgemat sagedust kontrollidel võrreldes KKK patsientidega mõlemas populatsioonis (Tabel 9).

Tabel 9. *ANXA5* promootori M2 riskihaplotüübi sagedus Eesti ja Taani valimis.

Valimi grupp	Indiviidide arv		Kandjate arv				Sagedus %		P-väärtus	
			Heterosügoot		homosügoot					
	DEN	EST	DEN	EST	DEN	EST	DEN	EST	DEN	EST
Patsient	227	86	36	12	4	1	9,7	8,1	0,198	0,052
Kontroll	115	100	25	23	2	3	12,6	15,2		

DEN – Taani valim

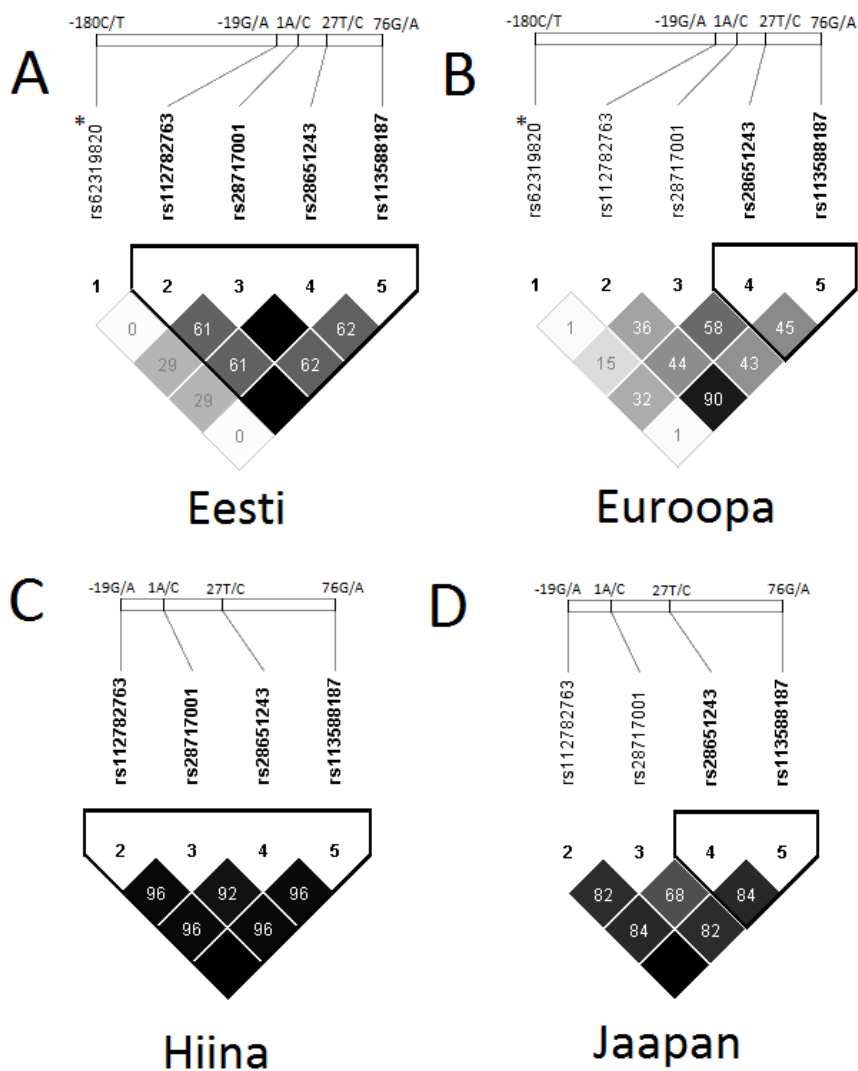
EST- Eesti valim

2.3.3. ANXA5 promootori SNP-d ja haplotüübid võrdlevalt populatsioonipõhiste kohortidega ning varasemalt publitseeritud uuringutega

2.3.3.1. ANXA5 promootori polümorfismide võrdlev analüüs

Selleks, et võrrelda Eesti ja Taani kontrollide seas määratud ANXA5 promootori SNP-de alleelisagedusi populatsioonipõhiste kohortide andmetega, võtsin erinevate populatsioonide genotüpiseerimise andmed *1000 genomes* projektist. Euroopa (CEU, n= 85), Hiina (CHB, n= 97) ja Jaapani (JPT, n= 89) andmetega tehti haplotüübiblokkide joonis Haploview-ga viie Eesti valimis tuvastatud SNP põhjal (-180C/T, -19G/A, 1A/C, 27T/C ja 76G/A). Kõikide populatsioonide lõikes on kõige suurem LD -19G/A ja 76G/A vahel ning -180C/T on kõige vähem LD-s teiste SNP-dega (Joonis 8). Kõige vähem esineb LD-d Euroopa CEU populatsioonis, samas kui Eestis, Jaapanis ja Hiinas on ANXA5 promootori SNP-de vahel tugev LD. Polümorfism -180C/T on Hiinas ja Jaapanis invariantne (Joonis 8).

Kuigi *annexin A5* promootoralas Eesti valimis tuvastatud 4 LD blokis esineva SNP (-19G/A, 1A/C, 27T/C ja 76G/A) minoorse alleeli sagedus on 2 korda kõrgem kontrollidel kui patsientidel (Tabel 7), on Eesti viljakate kontrollide seas määratud sagedused võrreldavad populatsioonipõhiste kohortide genotüpiseerimise andmestikuga. Minoorse alleeli sagedus antud positsioonides erines KORA ja 1000 genoomi CEU andmestikus maksimaalselt 3,0% Eesti valimi kontrollidest ning 2,6% Taani kontrollidest positsioonis 76G/A. Aasia populatsioonides on suurem varieeruvus antud 4 SNP minoorse alleeli sagedustes erinedes Euroopa andmestikust (Tabel 10). M2 haplotüüpi määrava 76G/A positsiooni puhul on kõrgeim alleeli sagedus Hiinas (17,0%) ja madalaim Jaapanis (10,1%) (Tabel 10).



Joonis 8. *ANXA5* promootorist tuvastatud 5 sagedasema SNP geneetilise aheldatuse mittetasakaalususe muster: **A.** Eestis **B.** Euroopas **C.** Hiinas **D.** Jaapanis. Esitatud on r^2 LD väärtused. Polümorfism -180C/T (rs62319820) on Hiinas ja Jaapanis invariantne.

Tabel 10. *Annexin A5* promootoralast tuvastatud 4 SNP minoorse alleeli sagedused võrreldes maailmaga

dbSNP ID		Minoorse alleeli sagedus %					
		Käesolev uuring		Üldine populatsiooni põhine andmestik			
				KORA	1000 genomes		
Populatsioon	Eesti	Taani	Saksamaa	Euroopa	Hiina	Jaapan	
rs112782763	Kontroll	15	a.p.	14,1	13,5	17	10,1
	Patsient	7,7	a.p.				
rs28717001	Kontroll	21,7	a.p.	22,6	24,7	16,5	10,7
	Patsient	13,4	a.p.				
rs28651243	Kontroll	21,7	a.p.	20,6	23,5	16,5	11,8
	Patsient	13,4	a.p.				
rs113588187	Kontroll	15,2	12,6	12,1	12,4	17	10,1
	Patsient	8,1	9,7				

a.p. - andmed puuduvad

Bold-iga on märgitud M2 haplotüüpi iseloomustav polümorfism

Saksamaa KORA S3 valim koguti Lõuna-Saksamaalt Augsburgi piirkonnast

1000 genomes valimid:

Euroopa - Põhja- ja Lääne-Euroopa päritoluga Utah elanikud (CEPH). Andmed 85 indiviidi kohta.

Hiina - Han hiinlased Pekingist Hiinast. Andmed 97 indiviidi kohta.

Jaapan - Jaapanlased Tokyost. Andmed 89 indiviidi kohta

2.3.3.2. *ANXA5* promootori haplotüüpide võrdlev analüüs

Võrdlev *ANXA5* promootori haplotüüpide jaotus eri 1000 genoomi populatsioonides määrati PHASE analüüsiga tuvastades lisaks levinud *wt*, M1 ja M2 haplotüüpidele veel 5 harva haplotüüpi (Lisa. Tabel 12). *ANXA5* promootoralast tuvastatud 3 levinud haplotüübi (*wt*, M1 ja M2) sagedused Euroopa CEU populatsioonis (vastavalt 70,6%; 7,6%; 12,4%) on sarnased Eesti kontrollide seas ennustatud haplotüüpide jaotusega (vastavalt 78,0%; 7,0%; 15%) (Tabel 11). Hiinas ja Jaapanis on 1000 genoomi andmetel ei esine M1 haplotüüpi, samas on riskihaplotüüp M2 sagedus on kõrgema sagedusega Hiinas (16,0%) ning madalama sagedusega Jaapanis (9,6%) võrreldes Eesti ja Taani kontrollidega (vastavalt 15,0% ja 12,6%).

Erinevalt varasemalt publitseeritud andmetest, on Eesti ja Taani KKK patsientidel vastavalt 0,5 ja 0,2 korda madalam M2 haplotüübi sagedus kui kontrollidel (Tabel 11). Saksamaal Münsteris läbi viidud uuringus esines M2 haplotüüp 2,8 korda enam kui kontrollidel (Bogdanova *et al.*, 2007), kuid haplotüüpide jaotus erineb märkimisväärselt Euroopa populatsioonipõhisest kohordist. M2 riskihaplotüübi puhul oli viljakate kontrollide seas sagedus 5,1%, uuringus kasutatud Põhja-Saksamaa populatsioonipõhises PopGen valimis 8,2% samas kui Euroopa CEU populatsioonis oli M2 sagedus 12,4% ning Eesti ja Taani

kontrollide seas vastavalt 15,2% ja 12,6% (Tabel 11). Ka järgnevad Euroopas läbi viidud *ANXA5* promootori geneetilised assotsiatsiooniuuringud tuvastasid madalama sageduse viljakatel kontrollidel kui Euroopa populatsioonides keskmiselt (Tabel 11) (Rogenhofer *et al.*, 2012; Tüttelmann *et al.*, 2013; Tiscia *et al.*, 2009).

Kuigi Miyamura *et al.*, 2011 tuvastas algselt Jaapani patsientidel riskihaplotüübi sageduse 5,5% ja kontrollidel 10,7% (1000 genoomi andmetel esineb M2 haplotüüpi Jaapani üldpopulatsioonis 9,6%-l), kirjeldas Hayashi *et al.*, 2013 Jaapanis haplotüüpide jaotust, mis ei erinenud oluliselt patsientide ja kontrollide vahel (Tabel 11). Sarnaselt Eesti valimiga, tuvastas Cao *et al.*, 2011 Hiinas riskihaplotüübi M2-spetsiifilise 75G/A minoorse alleeli kõrgema sageduse kontrollidel võrreldes KRK patsientidega (Tabel 11).

Tabel 11. ANXA5 promootorist tuvastatud haplotüüpide sagedused Eestis ja Taanis võrreldes maailmaga

Haplotüüpide sagedus (%)															
Haplo- tüübid	Käesolev uuring			Varasemalt publitseeritud andmed								Üldine populatsiooni põhine andmestik 1000 genomes			
	Andmete allikas	Populatsioon	Eesti	Taani	Bogdanova <i>et al.</i> 2007		Rogenhofer <i>et al.</i> , 2012#	Tüttelmann <i>et al.</i> , 2013#	Tiscia <i>et al.</i> , 2009	Hayashi <i>et al.</i> , 2013	Miyamura <i>et al.</i> 2011	Cao <i>et al.</i> 2013	Euroopa	Hiina	Jaapan
					Saksamaa	Saksamaa	Bulgaaria	Lõuna-Itaalia	Kesk-Jaapan	Kesk-Jaapan	Ida-Hiina				
					Münster	PopGen*	München								
wt	Kontroll	78,0	a.p.		82,9	87,9	81,7	88,0	89,0	89,0	93,7	a.p.	70,6	83,0	87,1
	Patsient	86,6	a.p.		80,0		78,3	84,3	78,2	88,0	88,9	a.p.			
M1	Kontroll	7,0	a.p.		12,0	3,9	10,0	4,5	3,3	<1	0,8	a.p.	7,6	0	0
	Patsient	5,2	a.p.		5,7		5,0	4,5	2,9	<1	0,4	a.p.			
M2	Kontroll	15,2	12,6		5,1	8,2	8,3	7,5	7,7	9,7	5,5	14,2	12,4	16,0	9,6
	Patsient	8,1	9,7		14,3		16,7	11,2	18,9	11,4	10,7	12,2			

Saksamaa KORA valimit ei saa kasutada, kuna imputeeritud andmetest ei saa haplotüüpe ennustada

Bold-iga on märgitud M2 haplotüüp

- Töodes kasutati ka Bogdanova *et al.*, 2007 Münsteri ja PopGeni valimit

* PopGen- Põhja-Saksamaa populatsioonipõhine kohort

1000 genomes valimid:

Euroopa - Põhja- ja Lääne-Euroopa päritoluga Utah elanikud (CEU). Andmed 85 indiviidi kohta.

Hiina - Han hiinlased Pekingist Hiinast. Andmed 97 indiviidi kohta.

Jaapan - Jaapanlased Tokyost. Andmed 89 indiviidi kohta.

a.p. - andmed puuduvad

2.4. Arutelu

2.4.1. ANXA5 geeni varieeruvus ja seos korduva raseduse katkemisega

Käesoleva töö raames on läbi viidud analüüsid ANXA5 promootori riskihaplotüübi seose tuvastamiseks raseduse katkemistega Eesti ja Taani valimites.

Töö tulemusena tuvastati promootoris 4 SNP-d (-19G/A, 1A/C, 27T/C ja 76G/A), mida on varasemalt seostatud KRK-ga (Bogdanova *et al.*, 2007). Tegemist on sagedaste polümorfismidega, mis esinevad Eesti (minoorse alleeli sagedus vastavalt 15%; 21,72%; 21,72%; 15,15%) ja Taani (76A 12,6%) kontrollgruppides sarnase sagedusega. Tulemuste õigsust kinnitab ka võrdlev analüüs Euroopa populatsioonidega nii 1000 genomes CEU populatsiooni põhjal (vastavalt 13,5%; 24,7%; 23,5%; 12,4%) kui ka Lõuna-Saksamaa populatsiooni-kohordi KORA andmestiku põhjal (14,1%; 22,6%; 20,6%; 12,1%) (Tabel 10).

Kuna ANXA5 promootori piirkonnas esines Eesti valimis tugev LD, siis leiti ootuspäraselt ka ainult 3 levinud haplotüüpi: *wild type*, M1 ja M2. Haplotüüp M2 puhul on näidatud *in vitro* vähenenud promootori aktiivsust 37-42%-ni normist ning haplotüübi kandjatel on varasemalt kirjeldatud 2,4 korda suurem risk korduvaks raseduse katkemiseks kui mittekanjatel (Bogdanova *et al.*, 2007). M2 suuremat sagedust KRK patsientide seas on replitseeritud eri uuringute poolt nii Euroopas kui ka Aasias (Tiscia *et al.*, 2009; Rogenhofer *et al.*, 2012; Tüttelmann *et al.*, 2013; Miyamura *et al.*, 2011), kuid enamusi uuringute puhul erineb kontrollidel leitud haplotüübi sagedus märkimisväärselt Euroopa CEU populatsioonist (Tabel 11).

Erinevalt varasemalt publitseeritud andmetest, on Eesti ja Taani KRK patsientidel vastavalt 0,5 ja 0,2 korda madalam M2 haplotüübi sagedus kui kontrollidel (Tabel 11). Sarnaselt kõrgemat sagedust on varasemalt kirjeldatud ka Hiina viljakatel kontrollidel (14,2% versus 12,2% KRK patsientidel) 76G/A SNP puhul, mis peegeldab M2 sagedust (Cao *et al.*, 2013). Samuti ei ole M2 seost korduva raseduse katkemisega leidnud kinnitust Hayashi *et al.*, 2013 poolt teostatud Jaapani KRK juht-kontroll uuringu raames (Tabel 11).

Seega ei ole vaatamata mitmete töödele M2 haplotüüpi endiselt üheselt seostatud korduva spontaanabordi esinemisega.

2.4.2. Kitsaskohad geneetilise assotsiatsiooni-uuringute teostamisel KRK puhul

Assotsiatsiooni-uuringute eesmärgiks on tuvastada kandidaatgeenide seotust haigustega, analüüsides geneetiliste variantide sageduste erinevusi mittedisainitud kontrollgrupi

indiviidide ja patsientide vahel (Kruglyak, 1999). Korduva spontaanabordi puhul on geneetiliste assotsiatsiooniuuringute läbiviimine suur väljakutse haiguse heterogeensuse ja laia riskifaktorite spektri tõttu. Enamus geneetilisi assotsiatsiooniuuringuid KRK kohta on olnud hüpoteesipõhised kandidaatgeeniuringud. Varasemalt on uuritud ligi 90 erineva geeni polümorfisme ning sarnaselt *ANXA5* põhjal läbi viidud geneetilistele assotsiatsiooniuuringutele ei leita enamuses juhtudel seost korduva spontaanabordiga või ei suudeta tulemust replitseerida järgnevates uuringutes (Rull *et al.*, 2012). Kõige sagedamini on uurimisobjektiks KRK naispatsient ning on uuritud immuunvastuse, põletike, ema metabolismi ja vere koagulatsiooniga seotud geene.

Nähtud erinevused *ANXA5* uuringute tulemustes võivad olla tingitud järgmistest põhjustest:

- 1) Uuringu ülesehitusest, KRK ja kontrollgrupi definitsioonist.
- 2) Keskendumisest KRK naistele, mitte paarile või platsentale.
- 3) Madalale statistilisele võimsusele väikese valimi tõttu.
- 4) Elustiili ja keskkonnafaktoritest raseduse ajal.
- 5) Sekundaarsetest radadest, mis mõjutavad valgu translatsiooni/metabolismi ning viivad erinevusteni genotüübi ja valgu taseme vahel.
- 6) Erinevate rahvuslike päritolude tõttu.

Erinevused KRK fenotüübi defineerimises on üks põhjustest, mis võib anda geneetilise assotsiatsiooniuuringu puhul valetulemusi. Osa *ANXA5* assotsiatsiooniuuringute raames defineeritakse KRK kui 3 järjestikuse raseduse katkemist (Miyamura *et al.*, 2011 ja Tiscia *et al.*, 2009), ülejäänute puhul on uuritud patsiente alates kahest järjestikusest spontaanabordist (Bogdanova *et al.*, 2007; Tüttelmann *et al.*, 2013; Rogenhofer *et al.*, 2012; Hayashi *et al.*, 2013 ja Cao *et al.*, 2013). Käesolevas uuringus on Eesti ja Taani valimisse kogutud KRK patsiendiks naised, kellel on esinenud kolm või enam raseduse katkemist enne 22. gestatsiooninädalat, et tagada võimalikult homogeenne patsientide grupp. Originaaltöös, mis raporteeris esmakordselt M2 haplotüübi seost KRK haigusega, koosnes patsientide grupp heterogeensest naiste valimist - 56 naisel 70-st esines raseduse katkemine I või II trimestril ning ülejäänud 14 naisel oli vähemalt üks surnult sünd (*stillbirth*) (Bogdanova *et al.*, 2007).

Ka kontrollgrupi valikul on lähtutud *annexin A5* puhul erinevatest definitsioonidest. Üldiselt defineeriti neid kui eduka rasedusega naised, kellel pole varasemalt esinenud raseduse katkemist. Käesolevasse uuringusse kaasati Eesti kontrollvalimisse nõ superviljakad naised, kellel oli vähemalt 3 elussünnitusega lõppenud rasedust, Taanis kontrollidel esines vähemalt 2 edukat sündi. Varasemate publikatsioonide puhul ei ole elussünnituste arvu viljakatel

kontrollidel mainitud (Bogdanova *et al.*, 2007) või on kaasatud naisi, kellel on esinenud vähemalt üks edukas sünnitus (Tiscia *et al.*, 2009; Miyamura *et al.*, 2011; Rogenhofer *et al.*, 2012; Hayashi *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2013; Tüttelmann *et al.*, 2013). See võib olla ebapiisav, kuna üks edukas sünnitus võis juhtuda juhuslikult ning see ei välista hilisemaid komplikatsioone (sekundaarne KRK). Samuti on kasutatud kontrollidena populatsioonipõhiseid kohorte või kontrollgruppe, mis hõlmavad nii viljakaid naisi kui kohordi indiviide (Bogdanova *et al.*, 2007; Tüttelmann *et al.*, 2013).

Lisaks võivad erinevused *ANXA5* uuringute tulemustes olla põhjustatud populatsioonide-spetsiifilistest eripäradest. Näiteks on Jaapani ja Hiina populatsioonis *ANXA5* promootoris tuvastatud SNP-d suuremas LD-s kui Euroopas (Joonis 8) ning rahvuste vahel esinevad suuremad SNP ja haplotüübisageduste erinevused (Tabelid 10 ja 11). Samuti võib probleemiks olla valimite väike suurus, mis ei võimalda leida väikese efektiga polümorfisme ning mis on sagedaseks probleemiks reproduktiivhaigustega seotud uuringutes (Visscher *et al.*, 2012; Montgomery *et al.*, 2014).

Oluliseks faktoriks geneetilise assotsiatsiooniuringu läbiviimisel on korrektne uuringute grupi koostamine ning genotüpiseerimise kvaliteet. Probleemidele uuringu läbiviimises võib viidata SNP-de ja haplotüüpide Hardy-Weinbergi tasakaalustamatus. Seega on tähelepanuväärne, et mitmetes varasemalt publitseeritud uuringutes esineb olulist kõrvalekallet Hardy-Weinbergi tasakaalust ühes (Bogdanova *et al.*, 2007; Rogenhofer *et al.*, 2012, Hayashi *et al.*, 2013) või mõlemas uuringugrupis (Tüttelmann *et al.*, 2013) (Tabel 11). Käesolevas uuringus on nii Eesti kui ka Taani KRK patsientidel ja viljakatel kontrollidel kõik polümorfismid Hardy-Weinbergi tasakaalus (Tabel 7).

ANXA5 geneetiliste assotsiatsiooniuringute heterogeensed tulemused ei erine varasemate trombofiilsete mutatsioonide töödest, kuna ühtegi geneetilist polümorfismi pole siiani KRK-ga üheselt seostatud (Christiansen *et al.*, 2008). Seega on välja pakutud, et KRK kujunemisel mängivad tõenäoliselt üksikute mutatsioonide asemel pigem rolli trombofiilsete polümorfismide akumulatsioon (Brenner *et al.*, 1999).

2.4.3. *ANXA5* bioloogiline roll kui geneetilist assotsiatsiooniuringut mõjutav faktor

Lisaks fenotüübi ja valimi definitsiooni küsimustele on üheks erinevuste allikaks uuringute vahel *ANXA5* selgelt määratlemata bioloogiline roll. Kuigi *annexin A5*-te on seostatud mitme haigusega, sealhulgas raseduspatoloogiatega nagu KRK (Bogdanova *et al.*, 2007), rasedusaegne veenitromboos (Grandone *et al.*, 2010), pre-eklampsia ja loote kasvupeetus

(Chinni *et al.*, 2009), siis annexin A5 metabolism ning seos geneetika ja valgu taseme vahel pole endiselt selgelt määratletud. Sifakis *et al.*, 2010 poolt läbi viidud uuringu põhjal on kirjeldatud vähenenud *annexin A5* mRNA ekspressiooni loote kasvupeetuse korral, kuid valgu tase on jäänud sarnaseks kontrollgrupile. Samuti ei ole promootori haplotüübi M2 puhul vähenenud mRNA ekspressiooni seostatud väiksema annexin A5 produktsiooniga. Pre-eklampsia ja loote kasvupeetuse puhul on kirjeldatud M2 haplotüübi kandjatel 2 korda madalamat *ANXA5* mRNA tase platsentas kui kontrollidel (Chinni *et al.*, 2009), samas kui valgu tase väheneb ainult 65%-ni normist (Gourvas *et al.*, 2014). KRK patsientide platsentade puhul, mis kannavad M2 haplotüüpi, ei esinenud korrelatsiooni vähenenud *ANXA5* mRNA transkriptsiooni ja valgu tasemega (Markoff *et al.*, 2010). Saadud tulemused viitavad, et *ANXA5* avaldumisel mängivad olulist rolli faktorid, mis mõjutavad mRNA translatsiooni ning seega tuleb *ANXA5* geneetiliste assotsiatsiooniuuringute tulemuste interpreteerimisel olla ettevaatlik.

ANXA5 geeniekspressiooni võivad potentsiaalselt mõjutada ka alternatiivsed mehhanismid nagu metülatsioon, kuna hiire pesastumata embrüos kolokaliseerub annexin A5 ootsüüdispetsiifilise DNA metüültransferaasi 1-ga (Doherty *et al.*, 2002). Lisaks asuvad *ANXA5* promootoris tuvastatud polümorfismid CpG saares (Joonis 4) ning M2 haplotüüpi määrav SNP 76G/A kolokaliseerub metülatsioonisaadikaga (cg08715877; UCSC genoomibrauser, <http://genome-euro.ucsc.edu/index.html>). Ühtlasi on promootoriala ka väga GC-rikas (75%), mis võib oluliselt raskendada *ANXA5* promootori amplifikatsiooni ja sekveneerimist. Käesolevas uuringus kinnitati sekveneerimise tulemused eraldi iseseisva PCR-i ja restriksiooniga ning võrreldi sõltumatute populatsiooni-põhiste andmetikega, et veenduda andmete õigsuses.

ANXA5-l on oluline roll platsentahattude pinnal, kus annexin A5 trimeerid moodustavad kaistva kristallkihi raku pinna fosfolipiididele, varjates neid hüübimise kaskaadis (Rand, 2000). Siiski pole endiselt selge, kas *annexin A5* valk süntsüütiotrofoblasti pinnal pärineb emalt vereringest või on produtseeritud platsenta poolt, mis on loote genoomiga. Seetõttu on KRK puhul kõige suuremaks probleemiks uurimisobjektide määramine.

Ota *et al.*, 2013 on määranud M2 haplotüübi ekspressiooni võrdlevalt pre-eklampsiaga emadel vereringest ja platsentas ning leidnud M2 kandjatel ekspressioonitaseme langust võrreldes mittekanjatega nii patsientidel kui ka kontrollidel. Samas ei erinenud *ANXA5* mRNA ekspressioonitase platsentas kahe uurimisgrupi vahel. Valgu tase oli M2 haplotüübiga platsentadel oluliselt langenud, kuid ema genotüübi järgi grupeerides, ei märgatud erinevust (Ota *et al.*, 2013). Tulemustest järeldati, et nii isalt kui emalt päritud M2 haplotüüp tõstab tõenäoliselt platsentas pre-eklampsia riski, häirides ema-loote tromboregulaatorset

funktsiooni. *ANXA5* geneetiliste assotsiatsiooniuuringute läbiviimisel tuleks seega eelkõige analüüsida paare, ehk paralleelselt nii ema kui isa ja/või fokuseeruda platsenta genoomile.

KOKKUVÕTE

Käesolevas uurimistöös anti ülevaade peamistest korduva raseduse katkemise põhjustest ning rohkem tähelepanu pöörati geneetilistele trombofiilsetele riskifaktoritele.

Lisaks anti ülevaade trombofiilia *ANXA5* geenist, mida on varasemalt kirjeldatud kui uue riskifaktorina korduva raseduse katkemises (KRK) (Bogdanova *et al.*, 2007), funktsioonist ning selle seostest raseduspatoloogiatega. Geeni promootoris on tuvastatud riskihaplotüüp M2, mis tõstab KRK riski. Töö eesmärgiks oli määrata *ANXA5* promootoris esinevate SNP-de ja haplotüüpide seost KRK-ga Eesti ja Taani valimis.

Eksperimentaalse osa eesmärgiks oli tuvastada Eesti KRK naiste ja viljakate kontrolide valimis *ANXA5* promootorist SNP-d sekveneerimise teel ja määrata promootoris esineva riskihaplotüübi M2 sagedust. Tulemusi kinnitati restriksioonianalüüsiga ning määrati M2 haplotüübi sagedus Taani valimis. Tulemusi analüüsiti programmidega PolyPhred, Genepop, PHASE, Haploview ja Network. Eesti valimi tulemusi replitseeriti Taani naiste valimis ning võrreldi andmebaasidega.

Töö tulemusena tuvastati promootoris 4 SNP-d (-19G/A, 1A/C, 27T/C ja 76G/A), mida on varasemalt seostatud KRK-ga (Bogdanova *et al.*, 2007). Tegemist on sagedaste polümorfismidega, mis esinevad Eesti ja Taani kontrollgruppides ning Euroopa populatsioonipõhistes kohortides sarnase sagedusega. *ANXA5* promootoripiirkonnas leiti 3 levinud haplotüüpi: *wild type*, M1 ja M2 riskihaplotüüp. Käesolevas uuringus leiti, et Eesti ja Taani KRK patsientidel on vastavalt 0,5 ja 0,2 korda madalam M2 haplotüübi sagedus kui kontrollidel. Kuigi käesoleva töö tulemused ei kinnita varasemalt KRK-ga seostatud töid (Bogdanova *et al.*, 2007; Tiscia *et al.*, 2009; Rogenhofer *et al.*, 2012; Tüttelmann *et al.*, 2013; Miyamura *et al.*, 2011), on siiski sarnaseid tulemusi varasemalt kirjeldatud Hayashi *et al.*, 2013 ja Cao *et al.*, 2013 töödes.

Seega ei ole vaatamata mitmetele töödele M2 haplotüüpi endiselt üheselt seostatud korduva spontaanabordi esinemisega. Põhjused võivad seisneda selles, et erinevates uuringutes on patsiendi ja kontrollgrupi definitsioon erinev või väikese valimi tõttu on madal statistiline võimsus.

ANXA5 geneetiliste assotsiatsiooniuuringute efektiivsuse tõstmiseks tuleks edaspidi arvestada mõlema nii ema kui isa ja/või platsenta genoomiga ning täpsemalt määratleda annexin A5 metabolism platsentas ja bioloogiline roll raseduse varajasel kulgemisel.

Annexin A5 gene promoter haplotype association with recurrent miscarriage in Estonian and Danish population

Diana Nõmmemäes

SUMMARY

Recurrent miscarriage is defined as three or more consecutive pregnancy losses before the 22. gestation week (Berry *et al.*, 1995). Pregnancy loss is a traumatic event both for the mother and the father and they wish to know what went wrong and how to avoid it in the future. However, about 50% of recurrent spontaneous abortions are idiopathic (Bricker and Farquharson, 2002) and that means the doctors cannot give definite answers to stressed parents.

Annexin A5 has been proposed as a novel recurrent miscarriage risk factor by Bogdanova *et al.*, 2007. ANXA5 has anticoagulant function in the placenta syncytiotrophoblast layer where it forms a protective antithrombotic shield (Rand *et al.*, 2003). Reduced levels of annexin A5 protein can lead to a placental infarction (Wang *et al.*, 1999). Bogdanova *et al.*, 2007 discovered a risk haplotype titled as M2 in the promoter region of ANXA5. Carriers of this haplotype were found to have 2,4 fold higher risk for recurrent miscarriage than non-carriers.

This study is aimed to address the genetic variance and haplotype structure of ANXA5 promoter in recurrent miscarriage case and fertile control of Estonia and Denmark. In this study we resequenced the ANXA5 promoter and determined the frequency of the risk haplotype M2 with restriction fragment length polymorphism method and with comparative genotyping data eas obtained for world-wide population-cohorts from 1000 genomes project and South-Germany KORA cohort. The frequency of these polymorphisms was highly similar between fertile Estonian and Danish controls of this study and European cohorts.

We found 4 SNP-s in the ANXA5 promoter (-19G/A, 1A/C, 27T/C ja 76G/A) that have previously been associated with recurrent spontaneous abortion (Bogdanova *et al.*, 2007). These SNP-s were common in European population and in Estonian and Danish population. Haplotype reconstruction analysis estimated 3 promoter haplotypes within the ANXA5 gene (*wild type*, M1, M2). In this study we found that in Estonian and Danish sample sets M2 haplotype is 0,5 ja 0,2 fold more frequent in patients than in controls. Although several previously published works have been reported associated between ANXA5 and recurrent miscarriage (Bogdanova *et al.*, 2007; Tiscia *et al.*, 2009; Rogenhofer *et al.*, 2012; Tüttelmann

et al., 2013; Miyamura *et al.*, 2011), two studies have not confirmed the association similar to the results of this study (Hayashi *et al.*, 2013 and Cao *et al.*, 2013).

Associations between M2 haplotype and recurrent spontaneous abortion are still under debate and require more knowledge about biological mechanism of annexin A5 action to benefit association studies and reveal its contribution to recurrent miscarriage disease.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- Abalovich, M., Gutierrez, S., Alcaraz, G., Maccallini, G., Garcia, A., Levalle, O. (2002). Overt and subclinical hypothyroidism complicating pregnancy. *Thyroid*. 12(1): 63-68.
- Bajekal, N., Li, T-C. (2000). Fibroids, infertility and pregnancy wastage. *Hum. Reprod. Update*. 6(6): 614-620.
- Bakar, F., Unlütürk, U., Baskal, N., Nebioglu, S. (2014). Annexin V expression and anti-annexin V antibodies in type 1 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 99(3):923-927.
- Bandelt, H-J., Forster, P., Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol*. 16:37-48
- Barrett, JC., Fry, B., Maller, J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 21(2):263-265.
- Bech, B.H., Nohr, E.A., Vaeth, M., Henriksen, T.B., Olsen, J. (2005). Coffee and fetal death: a cohort study with prospective data. *Am. J. Epidemiol*. 162(10): 983-990.
- Berry, C.W., Brambati, B., Eskes, T.K.A.B., Exalto, N., Fox, H., Geraedts, J.P.M., Gerhard, I., Gonzales Gomez, F., Grudzinskas, J.G.G., Hustin, J., Jouppila, P., Lindblom, B.K.A., Mantoni, M., Montenegro, N., Nogales Fernandes, F., O’Rahilly, R., Pedersen, J.F., Peters, P.W.J., Regan, L., Rushton, D.I., Straaten, H.W.M., Tarlatzis, B.C., Wells, M. (1995). The Euro-team early pregnancy (ETEP) protocol for recurrent miscarriage. *Hum. Reprod*. 10(6): 1516-1520.
- Bertina, R.M., Koeleman, B.P.C., Koster, T., Rosendaal, F.R., Dirven, R.J., de Ronde, H., van der Velden, P.A., Reitsma, P.H. (1994). Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 369(6475): 64-67.
- Blumenfeld, Z., Brenner, B. (1999). Thrombophilia-associated pregnancy wastage. *Fertil. Steril*. 72(5): 765-774.
- Bogdanova, N., Horst, J., Chlystun, M., Croucher, P.J.P., Nebel, A., Bohring, A., Todorova, A., Schreiber, S., Gerke, V., Krawcak, M., Markoff, A. (2007). A common haplotype of the annexin A5 (*ANXA5*) gene promoter is associated with recurrent pregnancy loss. *Hum. Mol. Genet*. 16: 573- 578.
- Branch, D.W., Gibson, M., Silver, R.M. (2010). Recurrent miscarriage. *N. Engl. J. Med*. 363: 1740-1747.

- Brenner, B., Sarig, G., Weiner, Z., Younis, J., Blumenfeld, Z., Lanir, N. (1999). Thrombophilic polymorphisms are common in women with fetal loss without apparent cause. *Thromb. Haemost.* 82(1): 6-9.
- Bricker, L., Farquharson, R.G. (2002). Types of pregnancy loss in recurrent miscarriage: implications for research and clinical practice. *Hum. Reprod.* 17(5): 1345-1350.
- Brosens, J.J., Gellersen, B. (2010). Something new about early pregnancy: decidual biosensing and natural embryo selection. *Ultrasound. Obstet. Gynecol.* 36:1-5
- Cao, Y., Zhang, Z., Xu, J., Yuan, W., Wang, J., Huang, X., Shen, Y., Du, J.(2013). The association of idiopathic recurrent pregnancy loss with polymorphisms in hemostasis-regulated genes. *Gene.* 530(2):248-252.
- Caohuy, H., Srivastava, M., Pollard, H.B. (1996). Membrane fusion protein synexin (annexin VII) as a Ca^{2+} /GTP sensor in exocytotic secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 10797–10802.
- Carcedo, M-T., Iglesias, J-M., Bances, P., Morgan, R.O., Fernandez, M-P. (2001). Functional analysis of the human annexin A5 gene promoter: a downstream DNA element and an upstream long terminal repeat regulate transcription. *Biochem. J.* 356: 571-579.
- Chinni, E., Tiscia, G.L., Colaizzo, D., Vergura, P., Margaglione, M., Grandone, E. (2009). Annexin V expression in human placenta is influenced by the carriership of the common haplotype M2. *Fertil. Steril.* 91(3): 940-942.
- Christiansen, O.B. (1996). A fresh look at the causes and treatments of recurrent miscarriage, especially its immunological aspects. *Hum. Reprod.* 2(4): 271-293.
- Christiansen, O.B., Nybo Andersen, A-M., Bosch, E., Daya, S., Delves, P.J., Hviid, T.V., Kutteh, W.H., Laird, S.M., Li, T-C., van der Ven, K. (2005). Evidence-based investigations and treatments of recurrent pregnancy loss. *Fertil. Steril.* 83(4): 821-839.
- Christiansen, O.B., Steffensen, R., Nielsen, H.S., Varming, K. (2008). Multifactorial etiology of recurrent miscarriage and its scientific and clinical implications. *Gynecol. Obstet. Invest.* 66: 257-267.
- Cocksedge, K.A., Saravelos, S.H., Metwally, M., Li, T-C. (2009). How common is polycystic ovary syndrome in recurrent miscarriage? *Reprod. Biomed. Online.* 19(4): 572-576.

- Craig, L.B., Ke, R.W., Kutteh, W.H. (2002). Increased prevalence of insulin resistance in women with a history of recurrent pregnancy loss. *Fertil. Steril.* 78(3): 487-490.
- Dizon-Townson, D.S., Meline, L., Nelson, L.M., Varner, M., Ward, K. (1997). Fetal carriers of the factor V Leiden mutation are prone to miscarriage and placental infarction. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 177(2): 402-405.
- Doherty, A.S., Bartolomei, M.S., Schultz, R.M. (2002). Regulation of stage-specific nuclear translocation of Dnmt1o during preimplantation mouse development. *Dev. Biol.* 242(2): 255-266.
- Evenson, D.P., Jost, L.K., Marshall, D., Zinaman, M.J., Clegg, E., Purvis, K., de Angelis, P., Claussen, O.P. (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.* 14(4): 1039-1049.
- Frosst, P., Blom, H.J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C.A., Matthews, R.G., Boers, G. J.H., den Heijer, M., Kluijtmans, L.A.J., van der Heuvel, L.P., Rozen, R. (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature. Genet.* 10(1): 111-113.
- Garcia-Enguidanos, A., Calle, M.E., Valero, J., Luna, S., Dominguez-Rojas, V. (2002). Risk factors in miscarriage: a review. *Eur. J. Obstet. Gynaecol. Reprod. Biol.* 102: 111-119
- Garzia, E., Borgato, S., Cozzi, V., Doi, P., Bulfamante, G., Persani, L., Cetlin, I. (2004). Lack of expression of endometrial prolactin in early implantation failure: a pilot study. *Hum. Reprod.* 19(8): 1911-1916.
- Gehring, N.H., Frede, U., Neu-Yilik, G., Hundsdoerfer, P., Vetter, B., Hentze, M.W., Kulozik, A.E. (2001). Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nature. Genet.* 28: 389-392.
- Gerke, V., Creutz, C.E., Moss, S.E. (2005). Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6(6):449-461.
- Gerke, V., Moss, S. (2002). Annexins: from structure to function. *Physiol. Rev.* 82(2):331-371.
- Gidon-Jeangirard, C., Hugel, B., Holl, V., Toti, F., Laplanche, J-L., Meyer, D., Freyssinet, J.M. (1999). Annexin V delays apoptosis while exerting an external constraint preventing the

release of CD4⁺ and PrP^C membrane particles in a human T lymphocyte model. *J. Immunol.* 162: (5712-5718).

Gordon, D. (2003). Viewing and Editing Assembled Sequences Using Consed.

Gourvas, V., Soultzis, N., Konstantinidou, A., Dalpa, E., Koukoura, O., Koutroulakis, D., Spandidos, D.A., Sifakis, S. (2014). Reduced ANXA5 mRNA and protein expression in pregnancies complicated by preeclampsia. *Thromb. Res.* 133(3): 495-500.

Grandone, E., Tiscia, G., Colaizzo, D., Vergura, P., Pisanelli, D., Margaglione, M. (2010). The haplotype M2 within the ANXA5 gene is independently associated with the occurrence of deep venous thrombosis. *Thromb. Haemost.* 103(5):1102-1103.

Guinto, E.R., Esmon, C.T. (1984). Loss of prothrombin and of factor Xa-factor Va interactions upon inactivation of factor Va by activated protein C. *J. Biol. Chem.* 259(22): 13986-13992.

Habayeb, O.M.H., Konje, J.C. (2004). The one-stop recurrent miscarriage clinic: an evaluation of its effectiveness and outcome. *Hum. Reprod.* 19(12): 2952-2958.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 41:95-98

Hay, P.E., Lamont, R.F., Taylor-Robinson, D., Morgan, D.J., Ison, C., Pearson, J. (1994). Abnormal bacterial colonisation of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage. *BMJ.* 308(6924): 295-298.

Hayashi, Y., Sasaki, H., Suzuki, S., Nishiyama, T., Kitaori, T., Mizutani, E., Suzumori, N., Sugiura-Ogasawara, M. (2013). Genotyping analyses for polymorphisms of ANXA5 gene in patients with recurrent pregnancy loss. *Fertil. Steril.* 100(4): 1018-1024.

Hill, J.A. (1995). T-helper 1-type immunity to trophoblast: evidence for a new immunological mechanism for recurrent abortion in women. *Hum. Reprod.* 10(Lisa2): 114-120.

Hill, J.A., Polgar, K., Harlow, B.L., Anderson, D.J. (1992). Evidence of embryo- and trophoblast- toxic cellular immune response(s) in women with recurrent spontaneous abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 166(4): 1044-1052.

Homer, H.A., Li, T-C., Cooke, I.D. (2000). The septate uterus: a review of management and reproductive outcome. *Fertil. Steril.* 73(1): 1-14.

- Hook, E.B. (1981). Rates of chromosome abnormalities at different maternal ages. *Obstet. Gynecol.* 58(3):282-285.
- Jivraj, S., Rai, R., Underwood, J., Regan, L. (2006). Genetic thrombophilic mutations among couples with recurrent miscarriage. *Hum. Reprod.* 21(5): 1161-1165.
- Kenis, H., van Genderen, H., Bennaghmouch, A., Rinia, H.A., Frederik, P., Narula, J., Hofstra, L., Reutelingsperger, C.P.M. (2004). *J. Biol. Chem.* 279: 52623-52629.
- Kovalevsky, G., Gracia, C.R., Berlin, J.A., Sammel, M.D., Barnhart, K.T. (2004). Evaluation of the association between hereditary thrombophilias and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Arch. Intern. Med.* 164(5): 558-563.
- Krikun, G., Lockwood, C.J., Wu, X.X., Zhou, X.D., Guller, S., Calandri, C., Guha, A., Nemerson, Y., Rand, J.H. (1994). The expression of the placental anticoagulant protein, annexin V, by villous trophoblasts: immunolocalization and in vitro regulation. *Placenta.* 15(6): 601-612.
- Kruglyak, L. (1999). Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat. Genet.* 22(2):139-144.
- Kupferminc, M.J., Eldor, A., Steinman, N., Many, A., Bar-Am, A., Jaffa, A., Fait, G., Lessing, J.B. (1999). Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N. Engl. J. Med.* 340(1): 9-13.
- Lane, D.A., Grant, P.J. (2000). Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood.* 95(5): 1517-1532.
- Larsen, E.C., Christiansen, O.B., Kolte, A.M., Macklon, N. (2013). New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC. Medicine.* 11: 154.
- Laude, I., Rongieres-Bertrand, C., Boyer-Neumann, C., Wolf, M., Mairovitz, V., Hugel, B., Freyssinet, J.M., Frydman, R., Meyer, D., Eschwege, V. (2001). Circulating procoagulant microparticles in women with unexplained pregnancy loss: a new insight. *Thromb. Haemost.* 85(1): 18-21.
- Lim, K.J.H., Odukoya, O.A., Li, T-C., Cooke, I.D. (1996). Cytokines and immuno-endocrine factors in recurrent miscarriage. *Hum. Reprod. Update.* 2(6): 469-481.

- Macklon, N.S., Geraedts, J.P.M., Fauser, B.C.J.M. (2002). Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Hum. Reprod. Update.* 8(4): 333-343.
- Markoff, A., Bogdanova, N., Knop, M., Rüffer, C., Kenis, H., Lux, P., Reutelingsperger, C., Todorov, V., Dworniczak, B., Horst, J., Gerke, V. (2007). Annexin A5 interacts with polycystin-1 and interferes with the polycystin-1 stimulated recruitment of E-cadherin into adherens junctions. *J. Mol. Biol.* 369: 954-966.
- Markoff, A., Gerdes, S., Feldner, S., Bogdanova, N., Gerke, V., Grandone, E. (2010). Reduced allele specific annexin A5 mRNA levels in placentas carrying the M2/ANXA5 allele. *Placenta.* 31(10): 937-940.
- McNamee, K., Dawood, F., Farquharson, R. (2012). Recurrent miscarriage and thrombophilia: an update. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 24(4): 229-234.
- Metwally, M., Saravelos, S.H., Ledger, W.L., Li, T-C. (2010). Body mass index and risk of miscarriage in women with recurrent miscarriage. *Fertil. Steril.* 94(1): 290-295.
- Miyamura, H., Nishizawa, H., Ota, S., Suzuki, M., Inagaki, A., Egusa, H., Nishiyama, S., Kato, T., Pryor-Koishi, K., Nakanishi, I., Fujita, T., Imayoshi, Y., Markoff, A., Yanagihara, I., Udagawa, Y., Kurahashi, H. (2011). Polymorphisms in the annexin A5 gene promoter in Japanese women with recurrent pregnancy loss. *Mol. Hum. Reprod.* 17 (7): 447-452.
- Montgomery, G.W., Zondervan, K.T., Nyholt, D.R. (2014). The future for genetic studies in reproduction. *Mol. Hum. Reprod.* 20(1): 1-14.
- Mosser, G., Ravanat, C., Freyssinet, J.M., Brisson, A. (1991). Sub-domain structure of lipid-bound annexin-V resolved by electron image analysis. *J. Mol. Biol.* 217(2): 241-245.
- Nagirnaja, L., Venclovas, Č., Rull, K., Jonas, K.C., Peltoketo, H., Christiansen, O.B., Kairys, V., Kivi, G., Steffensen, R., Huhtaniemi, I.T., Laan, M. (2012). Structural and functional analysis of rare missense mutations in human chorionic gonadotrophin β -subunit. *Mol. Hum. Reprod.* 18(8):379-390.
- Nielsen, C.T. (2012). Circulating microparticles in systemic lupus erythematosus. *Dan. Med. J.* 59(11): B4548.
- Nybo Andersen, A-M., Wohlfahrt, J., Christens, P., Olsen, J., Melbye, M. (2000). Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ.* 320: 1708-1712.

- Nybo Andersen, A-M., Andersen, P.K., Olsen, J., Grønbaek, M., Strandberg-Larsen, K. (2012). Moderate alcohol intake during pregnancy and risk of fetal death. *Int. J. Epidemiol.* 41(2): 405-413.
- Ogasawara, M., Aoki, K., Okada, S., Suzumori, K. (2000). Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil. Steril.* 73(2):300-304.
- Ota, S., Miyamura, H., Nishizawa, H., Inagaki, H., Inagaki, A., Inuzuka, H., Suzuki, M., Myazaki, J., Sekiya, T., Udagawa, Y., Kurahashi, H. (2013). Contribution of fetal ANXA5 gene promoter polymorphisms to the onset of pre-eclampsia. *Placenta.* 34(12): 1202-1210.
- Pigault, C., Follenius-Wund, A., Schmutz, M., Freyssinet, J.M., Brisson, A. (1994). Formation of two-dimensional arrays of annexin V on phosphatidylserine-containing liposomes. *J. Mol. Biol.* 236(1): 199-208.
- Pihusch, R., Buchholz, T., Lohse, P., Rübsamen, H., Rogenhofer, N., Hasbargen, U., Hiller, E., Thaler, C.J. (2001). Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. *Am. J. Reprod. Immunol.* 46(2): 124-131.
- Poort, S.R., Rosendaal, F.R., Reitsma, P.H., Bertina, R.M. (1996). A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood.* 88(10): 3698-3703.
- Quenby, S., Vince, G., Farquharson, R., Aplin, J. (2002). Recurrent miscarriage: a defect in nature's quality control? *Hum. Reprod.* 17(8): 1959-1963.
- Rai, R., Backos, M., Elgaddal, S., Shlebak, A., Regan, L. (2002b). Factor V Leiden and recurrent miscarriage – prospective outcome of untreated pregnancies. *Hum. Reprod.* 17(2): 442-445.
- Rai, R., Backos, M., Rushworth, F., Regan, L. (2000). Polycystic ovaries and recurrent miscarriage – a reappraisal. *Hum. Reprod.* 15(3): 612-615.
- Rai, R., Regan, L. (2006). Recurrent miscarriage. *Lancet.* 368: 601-611.
- Rai, R., Shlebak, A., Cohen, H., Backos, M., Holmes, Z., Marriott, K., Regan, L. (2001). Factor V Leiden and acquired activated protein C resistance among 1000 women with recurrent miscarriage. *Hum. Reprod.* 16(5): 961-965.

- Rai, R.S., Clifford, K., Cohen, H., Regan, L. (1995b). High prospective fetal loss rate in untreated pregnancies of women with recurrent miscarriage and antiphospholipid antibodies. *Hum. Reprod.* 10(12): 3301-3304.
- Rai, R.S., Regan, L., Clifford, K., Pickering, W., Dave, M., Mackie, I., McNally, T., Cohen, H. (1995a). Antiphospholipid antibodies and beta 2-glycoprotein-I in 500 women with recurrent miscarriage: results of a comprehensive screening approach. *Hum. Reprod.* 10(8): 2001-2005.
- Rand, J.H. (2000). Antiphospholipid antibody-mediated disruption of the annexin-V antithrombotic shield: a thrombogenic mechanism for the antiphospholipid syndrome. *J. Autoimmun.* 15: 107-111.
- Rand, J.H., Wu, X.X., Guller, S., Gil, J., Guha, A., Scher, J., Lockwood, C.J. (1994). Reduction of annexin-V (placental anticoagulant protein-I) on placental villi of women with antiphospholipid antibodies and recurrent spontaneous abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 171(6): 1566-1572.
- Raymond, M., Rousset, F. (1995). GENETPOP (version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenism. *J Hered.* 86 (3): 248-249
- Regan, L., Rai, R. (2002). Thrombophilia and pregnancy loss. *J. Reprod. Immunol.* 55: 163-180.
- Rey, E., Kahn, S.R., David, M., Shrier, I. (2003). Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta analysis. *Lancet.* 361: 901-908.
- Ribas-Maynou, J., Garcia-Peiro, A., Fernandes-Encinas, A., Amengual, M.J., Prada, E., Cortes, P., Navarro, J., Benet, J. (2012). Double stranded sperm DNA breaks, measured by comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PloS. One.* 7(9): e44679.
- Robertson, L., Wu, O., Langhorne, P., Twaddle, S., Clark, P., Lowe, G.D.O., Walker, I.D., Greaves, M., Brenkel, I., Regan, L., Greer, I.A. (2005). Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br. J. Haematol.* 132: 171-196.
- Robinson, L., Gallos, I.D., Conner, S.J., Rajkhowa, M., Miller, D., Lewis, S., Kirkman-Brown, J., Coomarasamy, A. (2012). The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod.* 27(10): 2908-2917.

- Rogenhofer, N., Engels, L., Bogdanova, N., Tüttelmann, F., Markoff, A., Thaler, C. (2012). Paternal and maternal carriage of the annexin A5 M2 haplotype are equal risk factors for recurrent pregnancy loss: a pilot study. *Fertil Steril.* 98(2): 383-388.
- Rogenhofer, N., Engels, L., Bogdanova, N., Tüttelmann, F., Thaler, C.J., Markoff, A. (2013). Independent association of the M2/ANXA5 haplotype with recurrent pregnancy loss (RPL) in PCOS patients. *Metabolism.* 62(8): 1057-1060.
- Rosendaal, F.R., Doggen, C.J., Zivelin, A., Arruda, V.R., Aiach, M., Siscovick, D.S., Hillarp, A., Watzke, H.H., Bernarni, F., Cumming, A.M., Preston, F.E., Reitsma, P.H. (1998). Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb. Haemost.* 79(4): 706-708.
- Rosenn, B., Miodovnik, M., Combs, C.A., Khoury, J., Siddigi, T.A. (1991). Pre-conception management of insulin-dependent diabetes: improvement of pregnancy outcome. *Obstet. Gynecol.* 77(6): 846-849.
- Rull, K., Christiansen, O.B., Nagirnaja, L., Steffensen, R., Margus, T., Laan, M. (2013). A modest but significant effect of CGB5 gene promoter polymorphisms in modulating the risk of recurrent miscarriage. *Fertil. Steril.* 99(7): 1930-1936.e6.
- Rull, K., Nagirnaja, L., Laan, M. (2012). Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future directions. *Front. Genet.* 3:34. doi: 10.3389/fgene.2012.00034
- Salker, M., Teklenburg, G., Molokhia, M., Lavery, S., Trew, G., Aojanepong, T., Mardon, H.J., Lokugamage, A.U., Rai, R., Landles, C., Roelen, B.A.J., Quenby, S., Kuijk, E.W., Kavelaars, A., Heijnen, C.J., Regan, L., Macklon, N.S., Brosens, J.J. (2010). Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. *PloS. One.* 5(4):e10287.
- Saravelos, S.H., Cocksedge, K.A., Li, T-C. (2008). Prevalence and diagnosis of congenital uterine anomalies in women with reproductive failure: a critical appraisal. *Hum. Reprod. Update.* 14(5): 415-429.
- Seaton, B.A. 1996. Annexins: molecular structure to cellular functions, p. 2-25. In R.G. Landes.

- Seok, H., Park, H.J., Lee, B.W., Kim, J.W., Jung, M., Lee, S.R., Park, K.H., Park, Y.G., Baik, H.H., Chung, J.H. (2013). Association of annexin A5 polymorphisms with obesity. *Biomed. Rep.* 1(4): 654-658.
- Shu, F., Sugimura, M., Kanayama, N., Kobayashi, H., Kobayashi, T., Terao, T. (2000). Immunohistochemical study of annexin V expression in placentae of preeclampsia. *Gynecol. Obstet. Invest.* 49(1): 17-23.
- Sifakis, S., Soufla, G., Koukoura, O., Soultzis, N., Koutroulakis, D., Maiz, N., Konstantinidou, A., Melissari, E., Spandidos, D.A. (2010). Decreased annexin A5 mRNA placental expression in pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Thromb. Res.* 125(4):326-331.
- Slama, R., Bouyer, J., Windham, G., Fenster, L., Werwatz, A., Swan, S.H. (2005). Influence of paternal age on the risk of spontaneous abortion. *Am. J. Epidemiol.* 161(9): 816-823.
- Sohma, H., Imai, S., Takei, N., Honda, H., Matsumoto, K., Utsumi, K., Matsuki, K., Hashimoto, E., Saito, T., Kokai, Y. (2013). Evaluation of annexin A5 as a biomarker for Alzheimer's disease and dementia with lewy bodies. *Front. Aging. Neurosci.* 5:15. doi: 10.3389/fnagi.2013.00015
- Song, G.J., Campos, B., Wagoner, L.E., Dedman, J.R., Walsh, R.A. (1998). Altered cardiac annexin mRNA and protein levels in the left ventricle of patients with end-stage heart failure of patients with end-stage heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30:443-451.
- Stephens, M., and Scheet, P. (2005). Accounting for Decay of Linkage Disequilibrium in Haplotype Inference and Missing-Data Imputation. *Am J Hum Genet.* 76:449-462.
- Stephens, M., Smith, N., and Donnelly, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet.* 68: 978-989.
- Stephenson, M.D. (1996). Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil. Steril.* 66(1):24-29.
- Stephenson, M.D., Awartani, K.A., Robinson, W.P. (2002). Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum. Reprod.* 17(2): 446-451

- Stray-Pedersen, B., Stray-Pedersen, S. (1984). Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 148(2): 140-146.
- Zinaman, M.J., Clegg, E.D., Brown, C.C., O'Connor, J., Selevan, S.G. (1996). Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil. Steril.* 65(3): 503-509.
- The 1000 Genomes Project Consortium.(2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature.* 491:56–65.
- Tiscia, G., Colaizzo, D., Chinni, E., Pisanelli, D., Sciannname, N., Favuzzi, G., Margaglione, M., Grandone, E. (2009). Haplotype M2 in the annexin A5 (ANXA5) gene and the occurrence of obstetric complications. *Thromb. Haemost.* 102(2):309-313.
- Tüttelmann, F., Ivanov, P., Dietzel, C., Sofroniou, A., Tsvyatkovska, T.M., Komsa-Penkova, R.S., Markoff, A., Wieacker, P., Bogdanova, N. (2013). Further insights into the role of the annexin A5 M2 haplotype as recurrent pregnancy loss factor, assessing timing of miscarriage and partner risk. *Fertil. Steril.* 100(5): 1321-1325.
- Wang, X., Campos, B., Kaetzel, M.A., Dedman, J.R. (1999). Annexin V is critical in the maintenance of murine placental integrity. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180(4): 1008-1016.
- Warburton, D., Fraser, F.C. (1964). Spontaneous abortion risks in man: data from reproductive histories collected in a medical genetics unit. *Am. J. Hum. Genet.* 16(1): 1-25
- Wegmann, T.G., Lin, H., Guilbert, L., Mosmann, T.R. (1993). Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol. Today.* 14(7): 353-356.
- Wichmann, H-E., Gieger, C., Illig, T. (2005). KORA-gen – resource for population genetics, controls and broad spectrum of disease phenotypes. *Gesundheitswesen.* 67 (Lisa 1): S26-S30.
- Visscher, P.M., Brown, M.A., McCarthy, M.I., Yang, J. (2012). Five years of GWAS discovery. *Am. J. Hum. Genet.* 90: 7-24.
- Woelfer, B., Salim, R., Banerjee, S., Elson, J., Regan, L., Jurkovic, D. (2001). Reproductive outcomes in women with congenital uterine anomalies detected by three-dimensional ultrasound screening. *Obstet. Gynecol.* 98(6): 1099-1103.

Vogt, E., Ng, A.K., Rote, N.S. (1997). Antiphosphatidylserine antibody removes annexin-V and facilitates the binding of prothrombin at the surface of a choriocarcinoma model of trophoblast differentiation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 177(4): 964-972.

von der Mark, K., Mollenhauer, J. (1997). Annexin V interactions with collagen. *Cell. Mol. Life. Sci.* 53:539-545.

Xin, H., Wang, H.L. (2011). Expression changes and clinical significance of annexin V in maternal blood and placenta in patients with preeclampsia. *Zhonghua. Fu. Chan. Ke. Za. Zhi.* 46: 88-93.

Yamaguchi, M., Kokai, Y., Imai, S., Utsumi, K., Matsumoto, K., Honda, H., Mizue, Y., Momma, M., Maeda, T., Toyomasu, S., Ito, Y.M., Kobayashi, S., Hashimoto, E., Saito, T., Sohma, H. (2010). Investigation of annexin A5 as a biomarker for Alzheimer's disease using neuronal cell culture and mouse model. *J. Neurosci. Res.* 88(12): 2682-2692.

Younis, J.S., Brenner, B., Ohel, G., Tal, J., Lanir, N., Ben-Ami, M. (2000). Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation can be associated with first-as well as second trimester recurrent pregnancy loss. *Am. J. Reprod. Immunol.* 43(1): 31-35.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://www.fluxus-engineering.com/>

<http://browser.1000genomes.org/index.html>

<http://www.tai.ee/et/tegevused/registrid/meditsiiniline-sunniregister-ja-raseduskatkestus-andmekogu/statistika>

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Coagulation_full.svg

<http://genome-euro.ucsc.edu/index.html>

LISAD

Tabel 12. ANXA5 promootorist tuvastatud haplotüübid Eesti valimist ja 1000 genomes andmestikust.

Haplo- tüübi nimi	Haplo- tüübi järjestus	Haplotüüpide sagedus (%)				
		Üldine populatsiooni põhine andmestik 1000 genomes			Käesolev uuring	
		Euroopa	Jaapan	Hiina	Eesti	
					Patsient	Kontroll
wt	GATG	70,59	87,08	82,99	86,63	78
M1	GCCG	7,65	0	0	5,23	7
M2	ACCA	12,35	9,55	15,98	8,14	15
	AATG	1,18	0	0	0	0
	GACG	3,53	1,69	0	0	0
	GCTG	4,71	1,12	0	0	0
	AACA	0	0,56	0,52	0	0
	ACTA	0	0	0,52	0	0

1000 genomes valimid:

Euroopa - Põhja- ja Lääne-Euroopa päritoluga Utah elanikud (CEPH). Andmed 85 indiviidi kohta.

Hiina - Han hiinlased Pekingist Hiinast. Andmed 97 indiviidi kohta.

Jaapan - Jaapanlased Tokyost. Andmed 89 indiviidi kohta.

LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ ELEKTROONILISEKS AVALDAMISEKS

Mina Diana Nõmmemees (sünnikuupäev 28.11.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Annexin A5 geeni promootori haplotüüpide seos korduva raseduse katkemisega Eesti ja Taani naistel“, mille juhendaja on Liina Nagiraja,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 4.06.2016 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26. mai 2014